

Institut für medizinische Immunologie

DISSERTATION

**Minderung der allogenen Immunogenität
künstlicher Gewebe am Modell Epithelien
durch Suppression der MHC-I-
Oberflächenexpression**

Zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturatum (Dr. rer. nat.)

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin

Dipl.-Ing. (FH) Biotech. Annette Busch

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. J.P. Rabe

Gutachter: 1. Prof. Dr. Thomas Börner
2. Prof. Dr. Hans-Dieter Volk
3. Prof. Dr. Reinhard Schwinzer

eingereicht: 14.3.2000

Datum der Promotion: 7.11.2000

Zusammenfassung

Die Expression von Haupthistokompatibilitätsantigenen auf der Zelloberfläche kernhaltiger Zellen ist die Hauptursache für die Detektion durch das Immunsystem und die Rejektion allogener Transplantate. Eine vielversprechende Strategie, die MHC-I-Expression auf der Zelloberfläche zu senken, ist der Einsatz intrazellulär lokalisierter Antikörpern, sogenannter Intrabodies. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals versucht, eine die Expression an MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche durch den Einsatz von anti-MHC-I-Intrabodies zu verhindern.

Ein Hauptproblem in der Transplantation ist der Mangel an geeignetem Spendermaterial. Um diesem Zustand entgegenzuwirken, wird versucht, adäquaten Organersatz durch Tissue Engineering bereitzustellen. Die *in vitro*-Züchtung autologer epithelialer Zellen zur Generierung transplantierbarer Hautstücke spielt heute bereits eine große Rolle bei der Transplantation artifizieller Gewebe. Ferner werden diverse vollsynthetische Materialien für diesen Zweck hergestellt. Eine Verbesserung in diesen Bereich würde die Generierung von nicht-immunogenen allogenen Keratinozyten darstellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden primäre Rattenkeratinozyten mit anti-MHC-I-Intrabodies transfiziert. Diese Zellen zeigten einen MHC-I-"knock-out"-Phänotyp, der in stark Intrabody-exprimierenden Keratinozyten auch nicht durch Interferon- verändert werden konnte. Eine starke Expression der Intrabodies war essentiell für die vollständige Zurückhaltung aller MHC-I-Moleküle in der Zelle. Neben der Applikation von Intrabodies in Rattenkeratinozyten konnte die MHC-I-Expression auf der Zelloberfläche von 293-Zellen und primären humanen Keratinozyten ebenfalls durch die Expression von anti-MHC-I-Intrabodies vermindert werden. Intrabodies als GFP-Fusionsproteine waren in der MHC-I-Retention effizienter als Intrabody-Moleküle allein. Im Vergleich mit dem ebenfalls MHC-I-bindenden adenoviralen Protein p19 bewirkten die eingesetzten anti-MHC-I-Intrabodies bei gleich starker Expression eine wesentlich stärkere "Downregulation" der MHC-I-Oberflächenexpression von 293-Zellen. Intrabody-exprimierende Zellen zeigten keine signifikanten morphologischen oder physiologischen Veränderungen gegenüber untransfizierten Zellen: Wachstum, die Expression anderer Oberflächenmoleküle und morphologische Erscheinung waren unverändert. Es konnte lediglich eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation von MHC-I-Molekülen detektiert werden. Die funktionelle Bedeutung der MHC-I-"Downregulation" durch Intrabodies konnte durch die stark verminderte zytolytische Aktivität zytotoxischer T-Zellen gegenüber Intrabody-exprimierender Rattenkeratinozyten im Vergleich zu unmodifizierten Zellen gezeigt werden.

In der vorliegenden Arbeit ist es erstmals gelungen, Zellen mit einem vollständigen MHC-I-"knock-out"-Phänotyp zu erzeugen - bisherige Modifikationen der MHC-I-Oberflächenexpression durch die Generierung β_2 -Mikroglobulin- oder TAP-defizienter Mäuse führte zu keinem restlosen Verlust der Klasse-I-Moleküle auf der Zelloberfläche. MHC-I-"downregulierte" Keratinozyten könnten in der Hauttransplantation anstelle der limitiert zur Verfügung stehenden autologen Zellen eingesetzt werden oder in Kombination mit synthetischen Materialien verwendet werden, wo sie durch die Sekretion von heilungsfördernden Faktoren eine Verbesserung des Wundheilungsprozesses bewirken würden.

Schlagworte:

Histokompatibilitätskomplex Klasse I (MHC I), Intrabodies, Transplantation, Haut, Ratte, Tissue Engineering, Keratinozyten

Abstract

The expression of major histocompatibility antigens on the surface of eucaryotic cells is the predominant reason for immunologic detection and the rejection of allogeneic transplants. A promising strategy to lower the MHC I expression on the cell surface is the use of intracellular localized antibodies, termed intrabodies. In this work it has been tried for the first time to prevent the expression of MHC class I molecules on the cell surface by intrabody expression.

A major problem in transplantation is the shortage of suitable donor material. To overcome this situation tissue engineering has and will continue to enlarge the scope of organ grafting. Today, the *in vitro* culture of autologous epithelial cells to generate transplantable skin sheets plays an important role in the transplantation of artificial tissues. Furthermore various fully synthetic materials are produced for transplantation. An improvement in this field could be the generation of non-immunogenic allogeneic keratinocytes.

Within this work primary rat keratinocytes have been transfected with anti-MHC-I-Intrabodies. These cells show a MHC I “knockout” phenotype, that could not be altered by IFN- γ . A strong intrabody expression was essential for the complete retention of all MHC I molecules inside the cell. Besides the application of intrabodies in keratinocytes the MHC I expression on the surface of 293 cells and human primary keratinocytes could be reduced by anti-MHC I intrabodies as well. Intrabodies in the form of GFP fusion proteins were more efficient in retaining MHC I molecules than intrabodies alone. In comparison with the also employed adenoviral protein p19 the applied intrabodies generated at the same expression level a much stronger down-regulation of the MHC I surface expression of 293 cells. Intrabody expressing cells did not show any significant morphologic or physiologic alterations compared to untransfected cells: growth, the expression of other surface molecules and the morphological appearance were unaltered. Merely an enhanced intracellular accumulation of MHC I molecules could be detected. The functional relevance of the MHC I down-regulation by intrabodies could be shown by the strong diminished cytolytic activity of cytotoxic T cells to intrabody expressing rat keratinocytes in comparison to unmodified cells.

In this work cells with a completely MHC I knock-out phenotype has been successfully generated for the first time – modifications of the MHC I surface expression by generation of β_2 -microglobulin or TAP deficient mice did not lead to a complete loss of all MHC I molecules on the cell surface so far. MHC I down-regulated keratinocytes could be employed in skin transplantation instead of the limited available autologous cells or utilized in combination with synthetic materials where they would induce an improvement of the healing process by

the secretion of cytokines.

Keywords:

Major histocompatibility complex (MHC I), intrabodies, transplantation, rat, tissue engineering, keratinocytes

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 11 |
| 1.1 | Möglichkeiten und Grenzen des Gewebeersatzes - Problem der Immunogenität allogener/syngener Transplantate | 11 |
| 1.2 | Grundlagen: Prozesse bei der Rejektion von Transplantaten | 12 |
| 1.2.1 | Der Ort des Eingriffs: Die MHC-I-assoziierte Antigenpräsentation | 12 |
| 1.3 | MHC-I-defiziente Organe: verbesserte Akzeptanz bei Transplantationen? | 15 |
| 1.3.1 | Eliminierung von TAP und α_2 -Mikroglobulin | 15 |
| 1.3.2 | Transplantation MHC-I-defizienter Organe | 16 |
| 1.4 | Inhibierung der MHC-Oberflächenexpression durch Intrabodies | 17 |
| 1.4.1 | Was sind Intrabodies? | 17 |
| 1.4.2 | Welche Intrabodies wurden bisher beschrieben? | 18 |
| 1.5 | Inhibierung der MHC-I-Oberflächenexpression durch virale Proteine | 20 |
| 1.5.1 | Inhibierung des MHC-I-Transports durch Bindung an MHC I | 20 |
| 1.5.2 | Proteolytische Spaltung des MHC-I-Moleküls | 22 |
| 1.5.3 | Inhibierung der Peptid-Translokation/-Beladung | 23 |
| 1.6 | Tissue Engineering: Herstellung von Gewebeverbänden <i>in vitro</i> | 25 |
| 1.6.1 | Was ist Tissue Engineering? | 25 |
| 1.7 | Tissue Engineering der Haut - ein potentielles Einsatzgebiet für MHC-I-modifizierte Epithelzellen? | 26 |
| 1.7.1 | Tissue Engineering der Epidermis | 27 |
| 1.7.2 | Tissue Engineering der Dermis | 28 |
| 1.7.3 | Tissue Engineering von kombinierter Dermis und Epidermis | 29 |
| 1.7.4 | Tissue Engineering mit Einsatz lebender Zellen: "Living Skin Equivalents" | 30 |
| 1.8 | Aufgabenstellung | 31 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2 | MATERIAL | 32 |
| 2.1 | Allgemeine technische Geräte | 32 |
| 2.2 | Geräte und Material für die Zellkultur | 32 |
| 2.3 | Geräte und Material für die Molekularbiologie und Biochemie | 33 |
| 2.4 | Chemikalien | 33 |
| 2.5 | Enzyme | 36 |
| 2.6 | Versuchssysteme ("Kits") | 36 |
| 2.7 | Zelllinien | 36 |
| 2.8 | Antikörper | 37 |
| 2.9 | Rattenstämme | 37 |
| 2.10 | Bakterienstämme | 37 |
| 2.11 | Expressionsvektoren | 38 |
| 2.12 | Allgemeine Plastikwaren | 38 |
| 2.13 | Sonstiges Verbrauchsmaterial | 38 |
| 2.14 | Allgemein verwendete Puffer | 39 |
| 2.15 | Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen | 40 |
| 3 | METHODEN | 42 |
| 3.1 | Überblick über die Abfolge der angewendeten Methoden | 42 |
| 3.2 | Molekularbiologische Methoden | 43 |
| 3.2.1 | Synthese der MHC-I-"downregulatorischen" Konstrukte | 43 |
| 3.2.2 | mRNA Isolierung | 47 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2.3 | Reverse Transkription von RNA | 48 |
| 3.2.4 | PCR-Reaktion | 49 |
| 3.2.5 | Klonierung der Konstrukte in Expressionsvektoren | 50 |
| 3.3 | Immunochemische Methoden | 54 |
| 3.3.1 | <i>in vitro</i> -Translation im TNT™ Retikulozytenlysat | 54 |
| 3.3.2 | Immunopräzipitation | 54 |
| 3.3.3 | SDS-PAGE Gelelektrophorese | 56 |
| 3.4 | Methoden der Durchflusszytometrie | 56 |
| 3.4.1 | Oberflächenmarkierung mit Antikörpern für die Durchflusszytometrie | 56 |
| 3.4.2 | Intrazelluläre Färbung mit Antikörpern für die Durchflusszytometrie | 57 |
| 3.4.3 | FACS-Analytik | 58 |
| 3.5 | Methoden der Zellkultur | 59 |
| 3.5.1 | Kultivierung von eukaryotischen Zellen | 59 |
| 3.5.2 | Etablierung einer primären Keratinozytenkultur | 59 |
| 3.5.3 | Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen | 60 |
| 3.5.4 | Transfektion von eukaryotischen Zellen | 60 |
| 3.5.5 | Etablierung stabil exprimierender Zellklone | 62 |
| 3.5.6 | Infektion von eukaryotischen Zellen mit Adenovirus | 62 |
| 3.5.7 | Separation von Zellen mittels Magnetpartikel | 63 |
| 3.5.8 | Die Gemischte Lymphozytenkultur | 63 |
| 3.5.9 | Zytotoxizitäts-Test | 64 |
| 3.6 | Transplantation von gezüchteten Rattenhautstücken | 68 |
| 3.6.1 | Transplantation von <i>in vitro</i> -generierten Hautschichten ohne ein unterstützendes Trägermaterial | 68 |
| 3.6.2 | Transplantation von auf Hyaluronsäuremembran ausgesäten Keratinozyten | 68 |
| 3.6.3 | Histologische Analytik | 68 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 4 | ERGEBNISSE | 69 |
| 4.1 | Erste Generierung MHC-I-"downregulatorischer" Proteine: | |
| | Das anti-Ratten-MHC-I- (RT1.A) Intrabody-Konstrukt Ox18Fab | 69 |
| 4.1.1 | <i>In vitro</i> -Translation des Intrabody-Konstrukts | 69 |
| 4.1.2 | Bestimmung der Nukleinsäuresequenz des anti-RT1.A-Intrabodies | 70 |
| 4.1.3 | Expression von anti-RT1.A-Fab-Intrabodies in COS-1-Zellen | 75 |
| 4.1.4 | Stabile Expression von anti-RT1.A-Fab-Intrabodies in NBT-II-Zellen | 76 |
| 4.2 | Zweites MHC-I-"downregulatorisches" Protein: | |
| | Das anti-human-MHC-I-Intrabody-Konstrukt 8KsFv | 77 |
| 4.2.1 | Expression von anti-human-MHC-I-Intrabodies in 293-Zellen | 78 |
| 4.2.2 | Expression von anti-human-MHC-I-Intrabodies in humanen Keratinozyten durch Adenovirus-Infektion | 79 |
| 4.3 | Dritte Generation der MHC-I-"downregulatorischen" Proteine: | |
| | Das anti-RT1.A-Intrabody-Konstrukt als single chain: Ox18sFv | 80 |
| 4.3.1 | stabile Expression von anti-RT1.A-sFv-Intrabodies in NBT-II Zellen | 80 |
| 4.4 | Die Lösung: | |
| | MHC-I-"downregulatorische" Proteine als GFP-Fusionsproteine | 80 |
| 4.4.1 | Expression von GFP-Fusionsproteinen in Rattenkeratinozyten: Ox18sFv und p19 | 80 |
| 4.4.2 | Expression von GFP-Fusionsproteinen in humanen 293-Zellen: 8KsFv und p19 | 86 |
| 4.5 | Charakterisierung Intrabody-exprimierender Zellen | 88 |
| 4.5.1 | Wird die Expression anderer Oberflächenmoleküle beeinträchtigt? | 88 |
| 4.5.2 | Was passiert mit den MHC-I-Molekülen in der Zelle? | 91 |
| 4.5.3 | Wie wirkt sich Interferon- γ auf die MHC-I-Expression aus? | 94 |
| 4.6 | Funktionelle Bedeutung der MHC-I-"downregulatorischen" Proteine | 96 |
| 4.6.1 | Zytotoxizitäts-Test mit Intrabody-exprimierenden Rattenkeratinozyten als Targetzellen | 96 |
| 4.6.2 | Transplantation von gezüchteten Rattenhautstücken | 101 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 5 | DISKUSSION | 102 |
| 5.1 | Ein anti-Ratten-MHC-I-Intrabody als Fab-Fragment: Ox18Fab | 102 |
| 5.1.1 | Synthese und Proteinnachweis | 102 |
| 5.1.2 | Expression von Ox18Fab in der epithelialen Rattenzelllinie NBT-II | 104 |
| 5.2 | Intrabodies als "single chain"-Fragmente: 8KsFv und Ox18sFv | 104 |
| 5.3 | Intrabody-GFP-Fusionsproteine: Ox18sFvGFP, 8KsFvGFP | 104 |
| 5.3.1 | Eine hohe Quantität an anti-MHC-I-Intrabodies ist essentiell für eine effektive Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression | 105 |
| 5.3.2 | Anti-human-MHC-I-Intrabodies sind effektiver in der Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression als das adenovirale Protein p19 | 106 |
| 5.4 | Charakterisierung anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Zellen | 107 |
| 5.4.1 | Andere Oberflächenmoleküle werden durch die Expression von Intrabodies nicht beeinträchtigt | 107 |
| 5.4.2 | Akkumulation von MHC-I-Molekülen in Intrabody-exprimierenden Zellen | 108 |
| 5.4.3 | In stark Intrabody-exprimierenden Zellen kann der MHC-I-"knock-out"-Phänotyp nicht durch Interferon- aufgehoben werden | 108 |
| 5.5 | Immunogenität anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Zellen <i>in vitro</i> | 108 |
| 5.5.1 | Geringere lytische Aktivität zytotoxischer T-Zellen gegenüber Intrabody-exprimierenden Zellen | 108 |
| 5.6 | Immunogenität anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Zellen <i>in vivo</i> | 109 |
| 5.6.1 | Das "NK-Zell-Problem" | 109 |
| 5.7 | Ausblick: Einsatz anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Zellen beim Tissue Engineering | 111 |

1 Einleitung

1.1 Möglichkeiten und Grenzen des Gewebeersatzes - Problem der Immunogenität allogener/syngener Transplantate

Neben der Organtransplantation zum Ersatz irreversibel geschädigter Organe (Nerven, Herz, Leber, etc.) hat sich in den letzten Jahren zunehmend auch die Zell- und Gewebetransplantation in der Medizin etabliert. So werden z.B. Insel- oder Purkinjezellen zur Restitution defekter Hormon-/Mediatorproduktion bei Diabetes mellitus bzw. Morbus Parkinson transplantiert, um die Thrombosierungsgefahr zu senken werden autologe (von demselben Individuum) Endothelzellen zur Beschichtung künstlicher Bypassmaterialien verwendet, zum Einsatz von Haut- und Brandverletzungen oder anderen ausgebreiteten Hautdefekten werden neben Spalthaut zunehmend *in vitro* gezüchtete "Keratinocyten-Sheets" eingesetzt und in der Knorpeltransplantation finden autologe Chondrozyten ihre Anwendung. Sogenannte "Tissue-Engineering"-Verfahren ermöglichen uns immer besser, Gewebe in der Zellkultur zu generieren, und diese anschließend zu transplantieren. Die Stammzellforschung hat dieser Entwicklung weiteren Auftrieb gegeben.

Heute wird im Allgemeinen autologes Material verwendet, wodurch immunologische Probleme einer Abstoßungsreaktion weitestgehend vermieden werden (obwohl teilweise auch autologes Material durch die Kultivierung "immunogen" wird, z.B. Knorpel). Autologes Material beinhaltet jedoch viele Limitationen - Verfügbarkeit, Zeitdauer zur Anzucht (wichtig z.B. bei Brandverletzungen). Daher geht die Forschung in die Richtung der Verwendung allogener (von einem anderen Mitglied derselben Spezies) oder xenogener (von einem Mitglied einer anderen Spezies) Zellen bzw. Gewebe. Doch stellt sich dort das Problem der Immunogenität.

Die *ex vivo*-Herstellung eines artifiziellen Gewebes aus wenigen Zellen erlaubt die Manipulation der antigenen Eigenschaften seiner Zellen *in vitro* und somit die Eliminierung von Genen, die für die Rejektion des Transplantats verantwortlich sind, oder die Einführung von Genen, die vor immunologischen Angriffen schützen. Dieser Ansatz könnte es ermöglichen, ein allogen oder xenogen transplantierbares Gewebe zu schaffen, das keiner oder nur einer verminderten Immunsuppression zur Verhinderung seiner Rejektion bedarf. Hierbei stellt die Verminderung der MHC-I-Expression einen potentiellen Ansatzpunkt dar, die allogene Immunogenität artifizieller Epithelien oder anderer Gewebe zu minimieren.

1.2 Grundlagen: Prozesse bei der Rejektion von Transplantaten

Bei der allogenen Transplantation stellen zellvermittelte Rejektionen das Hauptproblem dar. Akute Rejektionen werden durch T-Zellen ausgelöst, die allogene Unterschiede, vor allem der MHC-Antigene, erkennen.

Epithelzellen exprimieren konstitutiv MHC-I-Antigene, aufgrund der sie von CD8-positiven alloreaktiven zytotoxischen T-Zellen erkannt und lysiert werden können. Außerdem produzieren sie lösliche MHC-I-Antigene, die CD4-positiven T-Helferzellen (TH) von wirtseigenen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) oder den APZ des Transplantats präsentiert werden können. Diese können wiederum CD8-positive MHC-I-alloreaktive T-Zellen aktivieren.

MHC-I-Antigene werden - im Gegensatz zu MHC-II-Antigenen, die nur auf der Zelloberfläche von APZ oder zytokinaktivierten Gewebezellen vorkommen - auf allen kernhaltigen tierischen Zellen exprimiert. Es handelt sich um Heterodimere, die aus einem transmembranen Protein (human: HLA-A, -B, -C; Maus: H-2K, -D, -L; Ratte: RT1.A) von 45-49 kD (auch schwere oder α -Kette bezeichnet), einem nichtkovalent assoziierten Protein (β -Mikroglobulin) von 12 kD und einem Peptid aus acht bis zehn Aminosäuren bestehen [1].

1.2.1 Der Ort des Eingriffs: Die MHC-I-assozierte Antigenpräsentation

Peptide, die bei dem Abbau von Proteinen im Zytoplasma entstehen, werden ins Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transportiert. MHC-Ia-Ketten lagern sich im ER mit einem membrangebundenen Protein zusammen, dem Calnexin. Wenn dieser Komplex ein β -Mikroglobulin bindet, löst sich die α -Kette von Calnexin und das partiell gefaltete MHC-I-Molekül bindet dann an die TAP-1-Untereinheit des TAP-Komplexes (Transporter associated with Antigen Processing), indem es mit einem Chaperon, dem Calreticulin, in Wechselwirkung tritt. Das MHC-I-Molekül wird im ER zurückgehalten, bis es durch die Bindung eines Peptids freigesetzt wird und dabei seine Faltung vollendet (vgl. Abb. 1).

Peptide, die von MHC-I-Molekülen gebunden werden, entstehen vorwiegend durch den Abbau von Proteinen im Zytosol [3]. Sie werden durch proteolytische Spaltung durch einen Proteasekomplex, dem Proteasom, erzeugt und durch den TAP-Transporter in das Lumen des ER gebracht. Dort binden sie an den Komplex des partiell gefalteten MHC-I-Moleküls, wobei sich dieses vom TAP-Tapasin-Komplex löst. So kann der Peptid-MHC-Komplex anschließend über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche gebracht werden. MHC-Klasse-I-Moleküle verlassen das ER nur, wenn sie Peptide gebunden haben.

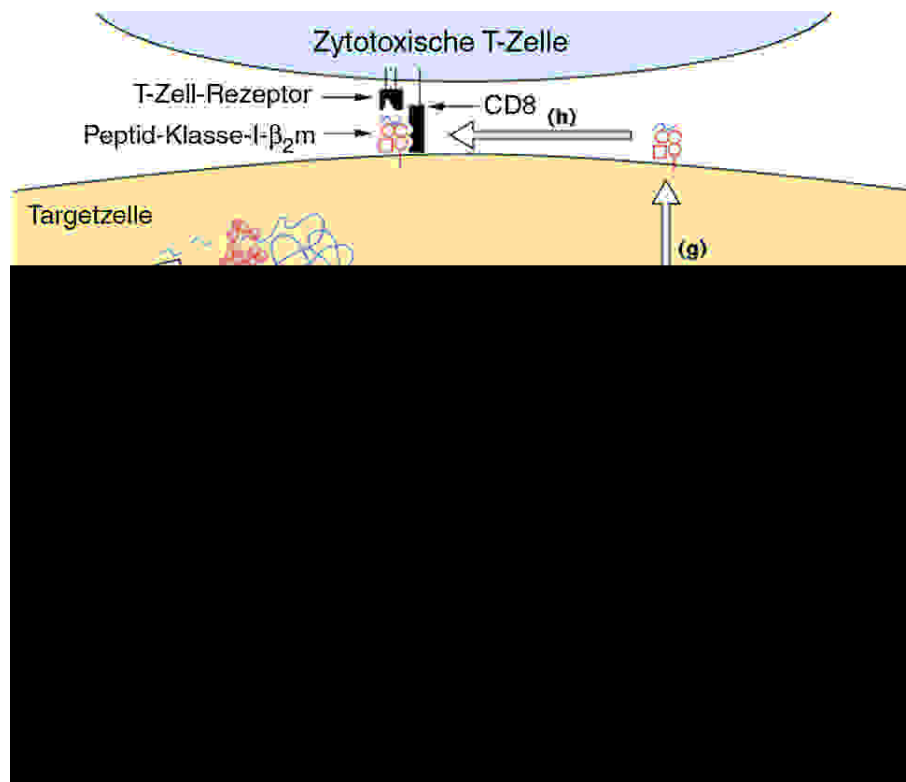


Abb. 1: Antigenprozessierung und Präsentation via MHC Klasse I (modifiziert nach [2]).

(a) Endogene Proteine werden durch das Proteasom gespalten und (b) die Peptide in das ER durch TAP-Dimere transportiert. Mehrere Moleküle im ER sind in dem Assemblierungsprozess involviert: (c) Calnexin und ERp57; (d) Calreticulin und α_2 -Mikroglobulin; und (e) Tapasin. (f) Stabile MHC-Peptidkomplexe können das ER via den Golgi-Apparat verlassen und (g) an die Zelloberfläche gelangen, wo sie (h) von zytotoxischen T-Zellen erkannt werden.

Das Proteasom besteht aus einem zylindrischen Komplex von vier Ringen, die jeweils aus sieben Untereinheiten zusammengesetzt sind. Es ist nicht genau bekannt, wie das Proteasom zytosolische Proteine abbaut. Wahrscheinlich müssen Proteine sich entfalten und sich durch das Zentrum der zylindrischen Struktur fädeln, damit ein Abbau erfolgen kann. Es ist nicht bekannt, ob das Proteasom die einzige zytolytische Protease ist, die Peptide für den Transport in das ER erzeugen kann, es wird jedoch als das Haupt-Werkzeug für die Degradation von Proteinen angesehen. Die Deletion von Untereinheiten des Proteasoms führt zu verminderter Oberflächenexpression von MHC I, jedoch nicht zur vollständigen Blockade der MHC-I-Assemblierung [4]. Dem MHC-I-Molekül selbst wird ebenfalls eine proteolytische Aktivität zugeschrieben [4, 5]. Ferner wird angenommen, dass für die finale Zuschneidung von Peptiden auf die optimale Länge von 8-10 Aminosäuren weitere Proteasen zuständig sind [6-9].

Ein vor kurzer Zeit entdecktes Protein, das ebenfalls am Assemblierungsprozess im ER beteiligt ist, ist das zur Familie der Proteindisulfidisomerasen (PDI) gehörende ERp57, auch ER60 genannt [10-14]. Es handelt sich hierbei um eine Thioloxydoreduktase, die an der korrekten Formation von Disulfidbrücken in Glykoproteinen beteiligt ist. Im Gegensatz zu anderen PDI, bindet ERp57 nur an frisch synthetisierte Glykoproteine. Es bildet Komplexe mit Calnexin und Calreticulin und man nimmt an, dass diese Komplexe für die spezifische Faltung von Glykoproteinen im ER-Lumen verantwortlich sind. Damit ist dieses Chaperon mit verantwortlich für die transiente Stabilisation des noch unvollständig assemblierten Klasse-I-Moleküls.

Ebenfalls an der korrekten Faltung des MHC-I-Moleküls beteiligt ist Calnexin (88kD) [15-17]. Dieses Molekül ist jedoch für den Faltungsprozess nicht essentiell, da Calnexin-negative Zelllinien eine Assemblierung der schweren Kette mit α_2 -Mikroglobulin aufweisen und MHC I auf der Zelloberfläche exprimieren [18, 19].

Das nächste Protein in der Assemblierungskette ist Calreticulin (60 kD), das eine hohe Homologie zu Calnexin aufweist [20]. Ähnlich wie Calnexin zeigt es eine hohe Spezifität für monoglykosylierte N-terminale Glykane an der schweren Kette [21]. Im Gegensatz zu Calnexin bindet Calreticulin jedoch nur Dimere der schweren Kette von MHC I [22].

TAP ist die letzte Station des assemblierten α -Kette- α_2 m-Calreticulin-ERp57-Komplexes. Es handelt sich hierbei um ein dimeres Protein, das sich aus den Untereinheiten TAP 1 (70 kD) und TAP 2 (72 kD) zusammensetzt. Beide Untereinheiten sind in der Membran des ER und des cis-Golgi verankert. Nur ein kleiner Teil ragt in das ER-Lumen hinein während der größte Teil einschließlich einer ATP-bindenden Kassette (ATP-binding cassette, ABC) im Zytosol lokalisiert ist [23]. Die Bindung des MHC-I-Komplexes geschieht an die Untereinheit TAP 1. TAP ist spezialisiert auf die Translokation zytosolischer Proteine in das ER-Lumen [24, 25]. Es werden bevorzugt Peptide mit einer Länge von 8-15 Aminosäuren transportiert, jedoch auch Hexamere oder 30-40-mere [26]. Der Peptidtransport ist ATP-abhängig.

Die Bindung des α -Kette- α_2 m-Calreticulin-ERp57-Komplexes an TAP wird durch ein weiteres Molekül vermittelt, dem Tapasin (48 kD). Dieses transmembrane, zur Familie der Immunoglobuline gehörende Glykoprotein [27, 28] wurde erstmals 1996 durch Koimmunopräzipitation mit der α -Kette des MHC-I-Moleküls und TAP identifiziert [22]. Die Isolierung dieses MHC-I-TAP-Komplexes ließ darauf schließen, dass jedes TAP-Heteromer mit je vier MHC-I-Tapasin-Calreticulin-Komplexen assoziiert ist [27]. Die Hauptfunktion des Tapasin liegt in der Retention leerer MHC-I-Komplexe im ER bis eine Beladung mit einem geeigneten Peptid stattgefunden hat [27, 29]. Somit hat es eine ähnliche Funktion wie das HLA-DM-Molekül in der Prozessierung von MHC Klasse II Molekülen, welches ebenfalls den Ersatz von CLIP durch Peptide höherer Affinität katalysiert [30, 31]. Weitere Funktionen

von Tapasin sind die Vermittlung einer besseren Bindung des MHC-I-Komplexes an TAP sowie die Verstärkung der Peptid-Translokation durch TAP [32]. Trotz dieser Multifunktionalität in der Antigen-Prozessierung ist Tapasin nicht essentiell für die Expression von MHC I. Während die Expression von einigen MHC-I-Molekülen wie B*4402 und HLA-B8 stark Tapasin-abhängig ist, können andere Moleküle, wie B*2705, HLA-A2, das murine H-2Kb sowie H-2Dd mit Peptiden ohne die qualitative Kontrolle durch Tapasin beladen werden [33-36].

1.3 MHC-I-defiziente Organe: verbesserte Akzeptanz bei Transplantationen?

1.3.1 Eliminierung von TAP und β_2 -Mikroglobulin

Die Expression von drei verschiedenen Genen, die eine hohe Allelzahl bei kodominanter Expression aufweisen [37], macht eine direkte gentechnische Eliminierung der HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Proteine der MHC-I-Moleküle problematisch. So ist bisher auf alternative Methoden zurückgegriffen worden, um eine MHC-I-Defizienz zu erzielen: zum einen die Deletion des MHC-I-assoziierten β_2 -Mikroglobulin, zum anderen die Deletion oder Inhibierung des TAP-Transporters.

Die Abwesenheit des monomorphen β_2 -Mikroglobulin führt zur Instabilisierung des Komplexes und zu verminderter Oberflächenexpression an MHC I [38]. Ebenfalls zu einer verminderten MHC-I-Oberflächenexpression führt der Mangel an geeigneten Peptiden. Zellen ohne funktionelle Peptidtransporter sind durch eine reduzierte MHC-I-Oberflächenexpression und eine verminderte Fähigkeit zur MHC-I-abhängigen Antigenpräsentation charakterisiert [39].

Basierend auf dieser Erkenntnis wurden β_2 m-knock-out- (β_2 m^{-/-}) bzw. TAP-knock-out- (TAP^{-/-}) Transplantate generiert und im Maus-Modell getestet [38, 40-43]. TAP^{-/-} und β_2 m^{-/-} Zellen zeigen immer noch geringe Mengen an MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche (ca. 10 % der konstitutiven Expression) [38, 41]. Die schwere Kette des MHC-I-Moleküls wird also auch ohne eine Assoziation mit β_2 -Mikroglobulin an die Zelloberfläche transportiert oder es existieren alternative Wege der Peptid-Beladung, wie die Bildung von Peptiden im ER aus den Signalsequenzen exportierter Proteine [44].

1.3.2 Transplantation MHC-I-defizienter Organe

Die Relevanz der MHC-I-Expression in der Transplantation allogener Organe ist in einigen Tiermodellen untersucht worden. Es wurden dabei β_2 -Mikroglobulin- oder TAP-defiziente Transplantate eingesetzt. Je nach Stärke des Transplantationsmodells konnten verlängerte Überlebenszeiten bis hin zu unbegrenzter Akzeptanz des Transplantats beobachtet werden. So überlebten pankreatische Inseln β_2 m-defizienter Mäuse unbegrenzt im allogenen Empfängertier [45], während im Lebertransplantationsmodell nur drei von sieben und im Herztransplantationsmodell zwei von fünf Transplantaten überlebten [46]. Weiterhin konnte die Abstoßung von Dünndarmtransplantaten nur von 9 auf 20 Tage hinausgezögert werden [47]. Ebenfalls wurden bei der Transplantation von T-Lymphomzellen TAP-/ β_2 m-doppelnegativer Mäuse diese von Wildtyp-Empfängern abgestoßen [41]. Bei der Transplantation von Nieren aus β_2 m^{-/-}-Mäusen konnte eine signifikante Verbesserung der Nierenfunktion im Gegensatz zu Wildtyp-Transplantaten beobachtet werden [48]. Hauttransplantate von TAP-/ β_2 m^{-/-}-Mäusen werden innerhalb von 13 Tagen abgestoßen, d.h. nur ca. 5-6 Tage verzögert [42, 43, 49].

An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass MHC-Klasse-II-defiziente Hauttransplantate (MHC-I-positiv) ohne Verzögerung abgestoßen werden [50].

Die im Großen und Ganzen positiven Auswirkungen der MHC-I-Defizienz auf die Überlebensdauer des Transplantats zeigen die Bedeutsamkeit des Klasse-I-Moleküls in der allogenen Transplantation. Dabei muss berücksichtigt werden, dass in allen bisher durchgeführten Experimenten die MHC-I-Defizienz durch Eliminierung des β_2 -Mikroglobulins bzw. des TAP-Transporters erreicht worden ist, die jedoch, wie schon erwähnt, keine vollständige Entfernung des Klasse-I-Moleküls von der Zelloberfläche zur Folge hat. Daher besteht die Hoffnung, dass durch einen vollständigen phänotypischen "knock-out" der MHC-I-Expression noch bessere Resultate in der allogenen Transplantation zu erzielen sind. Eine vielversprechende Strategie hierfür könnte der Einsatz sogenannter "Intrabodies" oder viraler MHC-I-modulatorischer Proteine sein.

1.4 Inhibierung der MHC-Oberflächenexpression durch Intrabodies

1.4.1 Was sind Intrabodies?

Bei Intrabodies handelt es sich um Antikörperfragmente, die durch eine Retentionssequenz im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten werden und dort durch Bindung an ihre Zielmoleküle den Transport dieser an die Oberfläche verhindern. Beschrieben wurde der Einsatz intrazellulärer Antikörper in eukaryotischen Zellen zuerst 1990 von der Gruppe Cattaneo et al. (Institute of Neurobiology, Rom, Italien) [51, 52]; der Begriff "Intrabody" wurde erstmals 1994 von der Gruppe Marasco et al. (Dana-Farber Cancer Institute, Boston, USA) definiert [53]. Im weiteren Sinne können dazu auch Antikörperfragmente gezählt werden, die in anderen Kompartimenten der Zelle, wie z.B. im Zytoplasma oder im Nukleus lokalisiert sind. Die Lokalisation im ER wurde durch die C-terminale Addition eines Retentionssignals Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL) erreicht. Allerdings wurde auch ein Intrabody ohne derartiges Signal im ER zurückgehalten [54]. Die Ursache dieses unerwarteten Verhaltens ist bislang unbekannt. So ist vorerst unklar, ob die Retention im ER ohne Existenz des KDEL-Signals ein singuläres Phänomen ist oder ob sie für alle sFv-Antigenkomplexe zutrifft.

Intrabodies werden meistens als Fab- oder sogenannte "single chain" (sFv)-Fragmente eingesetzt. Je nach Antikörpermolekül ist eine der beiden Varianten stabiler. Oft fällt die Wahl auf die kleinere Form der beiden, das sFv-Fragment, das nur aus den variablen Regionen des Antikörpers (VL bzw. VH) besteht. Zur Vermeidung der Dissoziation der Fragmente von schwerer und leichter Kette sind die beiden über einen Peptidlinker miteinander verknüpft. Als Linker dient meist ein Peptid der Sequenz (Gly4Ser)₃ [55]. Bei einigen sFv-Fragmenten wurden auch Disulfidbrücken zur Verbindung und/oder Stabilisation beider Ketten eingeführt [56]. Ursprünglich wurden sFv-Fragmente hergestellt, um die Immunogenität der konstanten Domänen für eine *in vivo*-Applikation am Menschen zu senken, um gentechnisch neue Effektorfunktionen mit der Spezifität eines Antikörpers zu vereinen und um die Fähigkeit zur Gewebspenetration zu verbessern [57].

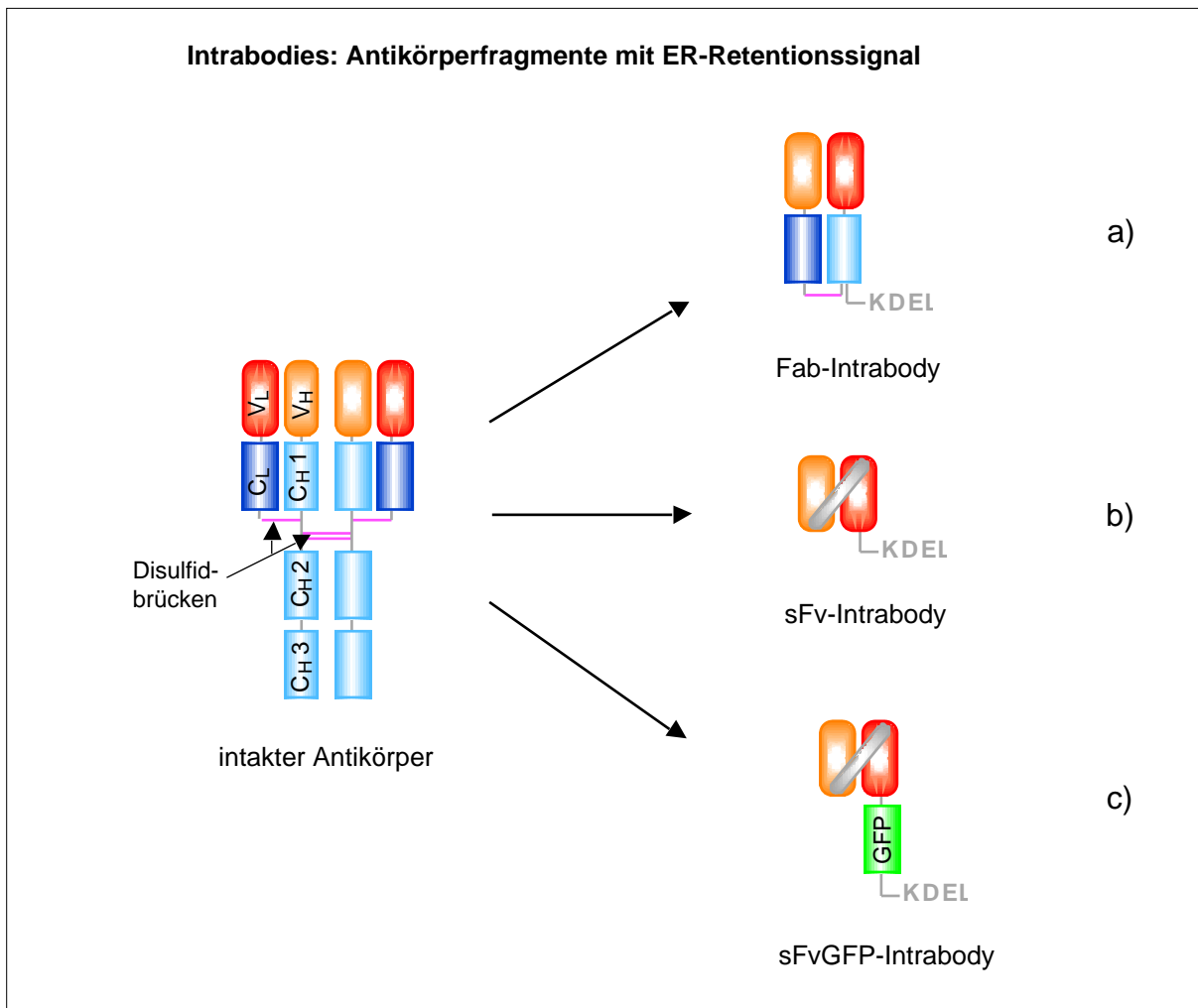


Abb. 2: Intrabodies können als verschiedenen Formen von Antikörperfragmenten synthetisiert werden. Gängige Formen sind a) Fab-Fragmente und b) "single chain"-Fragmente (sFv). Zur besseren Detektion können sie mit fluoreszierenden Proteinen gekoppelt werden, wie im Fall c) mit dem "green fluorescent protein" (GFP). sFv-Fragmente bestehen aus den variablen Regionen eines Antikörpers, die durch einem Peptidlinker miteinander verbunden sind.

1.4.2 Welche Intrabodies wurden bisher beschrieben?

Die intrazelluläre Expression von sFv-Antikörperfragmenten in eukaryotischen Zellen wurde bereits mehrfach erfolgreich praktiziert.

Mit ER-residenten sFv-Fragmenten konnte die Expression diverser Rezeptoren an der Zelloberfläche verhindert werden. Hierbei ist die "Downregulation" des T-Zell-Moleküls CD2 [58], der α -Kette des IL-2-Rezeptors in mehreren T-Zelllinien inklusive HTLV-I-

transformierter T-Zelle [59, 60], des EGF-Rezeptors [61] sowie des VLA-2-Antigens durch Intrabodies zu nennen [62].

Sehr erfolgversprechend ist bisher der Einsatz von Intrabodies, die gegen Onkoproteine gerichtet sind. So konnte die Oberflächenexpression und Aktivierung des ErbB-2-Rezeptors, dessen Überexpression in vielen humanen Tumoren, wie beim Ovarial- und Mammakarzinom [63], vorhanden ist, durch anti-ErbB-2-Intrabodies inhibiert werden [63, 64]. Die phänotypischen Effekte, die durch anti-ErbB-2-Intrabodies erzielt wurden, waren unterschiedlich: so wurde in mit ErbB-2-transformierten NIH3T3-Fibroblasten eine Reversion zum untransformierten Phänotyp beobachtet [64] - auf andere, ErbB-2 überexprimierende Zellen, wie Ovarial-, Lungen- und Brustkarzinomzellen hatte die Intrabody-Expression einen zytotoxischen Effekt, nicht jedoch auf regulär ErbB-2 exprimierende Zellen [65-68]. Durch die Fähigkeit der anti-ErbB-2-Intrabodies, Tumorzellen zu eliminieren, wäre ihr Einsatz als Krebstherapeutikum denkbar. *In vivo* wurden humane Ovarialkarzinomzellen nach dem Transfer in Nacktmäuse durch die Injektion von anti-ErbB-2-Intrabodies lysiert [69]. Diese Tumor-transplantierten Mäuse überlebten länger, wenn intraperitoneal anti-ErbB-2-Intrabody-Adenoviruskonstrukte appliziert wurden [70, 71]. Das Hauptproblem hierbei ist jedoch ein quantitativer gezielter Gentransfer *in vivo*.

Neben Intrabodies gegen ErbB-2 wurden auch Intrabodies gegen das p21ras Onkogen eingesetzt. Im Zytosol lokalisierte Intrabodies inhibierten in vielen Zelllinien die ras vermittelte Signaltransduktion [72-76]. Vor kurzem konnte *in vitro* gezeigt werden, dass ein p21ras-neutralisierender Intrabody die Apoptose in humanen Tumorzellen, nicht jedoch in untransformierten Zellen induzieren konnte [76]. Überdies führte die Transduktion von Kolonkarzinomzellen mit einem anti-p21ras Adenoviruskonstrukt zu anhaltender Tumorregression in Nacktmäusen [76].

Antivirale Effekte von Intrabodies wurden umfassend für die Inhibierung der HIV-Replikation *in vitro* untersucht. So konnte ein zytoplasmatischer Intrabody gegen das p17 Matrixprotein die HIV-1-Infektion in mitotischen T-Zellen inhibieren [77]. Ein weiteres sFv-Fragment mit Spezifität für gp120 inhibierte bei Expression im endoplasmatischen Retikulum (ER) die Prozessierung des Envelope Precursors [54]. Als Folge wurde eine Verminderung der Infektiösität der produzierten viralen Partikel und eine Inhibierung der Synzytienformation beobachtet. Des Weiteren führten Intrabodies gegen die Reverse Transkriptase und Integrase in T-Zellen zur Resistenz gegen das Virus [78, 79]. Schließlich konnte durch anti-Tat- und anti-Rev-Intrabodies die HIV-Replikation in infizierten Zellen inhibiert werden [80-82].

1.5 Inhibierung der MHC-I-Oberflächenexpression durch virale Proteine

DNA-Viren haben diverse Strategien entwickelt, um eine Präsentation von Virus-Peptiden zu verhindern und so der Immunantwort des Wirts zu entkommen. Besonders große persistierende DNA-Viren, wie die zur Familie der Herpesviren gehörenden Herpes Simplex Virus (HSV) und humanes Zytomegalievirus (HCMV), haben sich im Laufe der Koevolution mit ihrem Wirt hervorragend an die Wirtszellen angepasst. Einige Virus-Strategien zur Inhibierung der MHC-I-Oberflächenexpression sind nachfolgend beschrieben.

1.5.1 Inhibierung des MHC-I-Transports durch Bindung an MHC I

Die einfachste Variante, den Transport des MHC-I-Moleküls an die Zelloberfläche zu verhindern, ist die Rückhaltung des Moleküls im ER durch Bindung. Diese Strategie wird von den verschiedenen viralen Proteinen p19, US3 und m152 (p34/40) verwendet (vgl. Abb. 3).

Der Prototyp des viralen Eingriffs in die MHC-I assoziierte Antigenpräsentation wurde in den nicht-onkogenen Adenoviren entdeckt: das p19-Glykoprotein (19 kD), kodiert durch die E3-Region [83-86]. Es inhibiert den intrazellulären Transport des MHC-I-Moleküls, indem es mit ihm einen stabilen Komplex im ER eingeht. Verantwortlich für die Rückhaltung des p19-Proteins, und so auch des MHC I, ist ein Doppel-Lysin-Motiv am Carboxy-Terminus, das bei vielen ER-residenten Proteinen vertreten ist [87-89]. Es setzt sich aus Aminosäuren in der Reihenfolge KKXX oder KKKXX (Einzelbuchstabencode, X = beliebige Aminosäure) zusammen und ist verantwortlich für die Erkennung durch den Koatomer-Komplex COP I, die "ausgebüchste" Proteine aus Golgi-Vesikeln wieder ins ER zurückbringen [89-91]. p19 setzt sich aus 142 Aminosäuren zusammen, von denen 104 auf der luminalen Seite des ER, 23 in der ER-Membran und 15 im Zytosol lokalisiert sind [92, 93]. Da p19 das MHC-Molekül auf der luminalen Seite des ER bindet, kann der gesamte p19-MHC-I-Komplex auf diese Art im ER zurückgehalten werden. Durch Exon-Shuffling-Experimente zwischen zurückgehaltenen und freigesetzten (mutierten) MHC-I-Molekülen sowie durch Analyse von p19-Mutanten in Koimmunopräzipitationen konnte als Bindungsort die Peptidbindungsstelle (die $\alpha 1/\alpha 2$ -Domäne) des MHC-I-Moleküls determiniert werden [94, 95]. Eine weitere Funktion bezüglich der Inhibierung der Antigenpräsentation wurde kürzlich von Bennet et al. beschrieben [96]. Demnach bindet p19 an TAP und verhindert so die Bindung des Tapasin-MHC-I-Komplexes an TAP. Durch diese duale Funktion kann das Virus auch die Antigenpräsentation von Allelen, welche es nur schwach binden kann, verhindern.

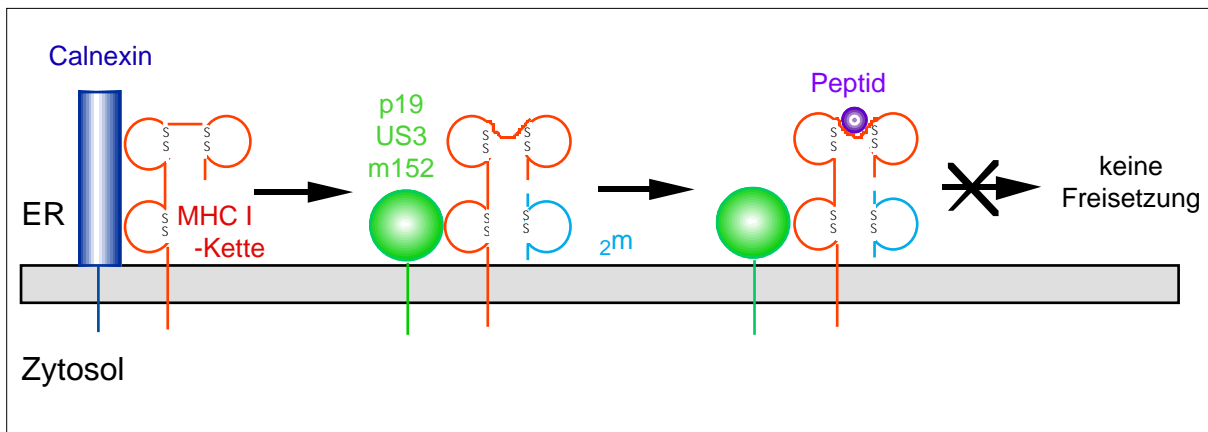


Abb. 3: Durch Bindung von den viralen Proteinen p19, US3 oder m152 wird der Transport des assemblierten und mit Peptid beladenen MHC-I-Moleküls verhindert.

Ein weiteres Protein, das sich ebenfalls dieses Bindungsmechanismus bedient, ist das US3-Protein (32/33 kD) des humanen Zytomegalievirus (HCMV). Es wird in der IE- (immediate early-) Region des Genoms kodiert und ist somit ein sehr früh exprimiertes Protein. Wie p19 kann auch US3 mit MHC-I-Molekülen kopräzipitiert werden [97], eine ER-Retentionssequenz wie das Doppel-Lysin-Motiv ist jedoch nicht vorhanden [98]. Der genaue Wirkungsmechanismus der Retention von MHC I durch US3 ist noch unklar.

Das Gen m152 des murinen Zytomegalievirus (MCMV) kodiert ein 40 kD großes Glykoprotein [99], das ebenfalls in der Lage ist den Transport des MHC-I-Moleküls an die Zelloberfläche zu verhindern. Das Transkriptionsmaximum wird dabei zwischen vier und sechs Stunden nach der Infektion erreicht [98]. Im Gegensatz zu US3 und p19 ist dieses Protein nicht im ER, sondern durch eine entsprechende carboxyterminale Retentionssequenz im ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment) lokalisiert. Am Carboxy-Terminus deletiertes m152 ist immer noch in der Lage, MHC-I-Moleküle in einem pre-Golgi Kompartiment zurückzuhalten [98], was die Annahme zulässt, dass hier ein ähnlicher Mechanismus wie bei dem US3-Protein vorliegt. Neben der ungewöhnlichen Lokalisation des m152-Moleküls ist es bis jetzt nicht als Komplex mit dem MHC-I-Molekül isoliert worden. Ob diese fehlende Assoziation eine sehr schwache Bindung reflektiert, die in den bei der Isolierung verwendeten Detergenzien instabil ist oder überhaupt keine direkte Bindung an das MHC-I-Molekül stattfindet ist unklar.

1.5.2 Proteolytische Spaltung des MHC-I-Moleküls

Proteine wie US2 und US11 des humanen Zytomegalievirus halten das MHC-I-Molekül nicht nur zurück sondern sind in der Lage, den MHC-I-Komplex aus dem ER in das Zytosol zu exportieren, wo er dann durch das Proteasom proteolytisch abgebaut werden kann (vgl. Abb. 4).

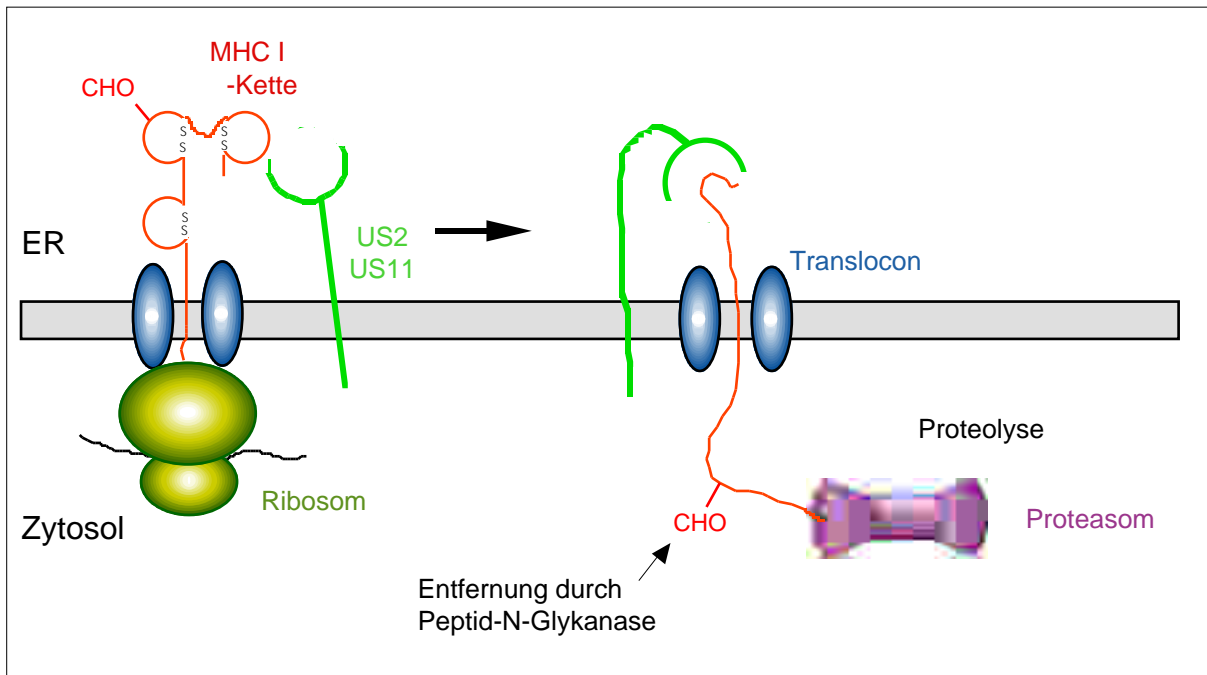


Abb. 4: Durch US2 und US11 wird die neu synthetisierte schwere Kette des MHC-I-Moleküls zurück ins Zytosol transloziert, wo sie nach Deglykosylierung durch das Proteasom degradiert wird.

US2 und US11 sind frühe (early) Gene der US-Region, die nach US3 (immediate early) transkribiert werden [100]. Beide Gene können unabhängig voneinander diese Degradation bewirken [101]. Es handelt sich um transmembrane Glykoproteine, die in der Lage sind, das neu synthetisierte MHC-I-Molekül vom ER in das Zytosol zu translozieren. Da die schwere Kette des MHC-I-Moleküls trotz Anwesenheit von US11 oder US2 glykosyliert ist, muß sie bereits in der ER-Membran verankert sein, bevor sie aus diesem Kompartiment exportiert wird [101]. Im Zytosol wird dieses Glykan sofort durch eine N-Glykanase entfernt und die schwere Kette wird mit einer Halbwertszeit von weniger als einer Minute durch das Proteasom degradiert [101]. Proteasom-Inhibitoren konnten diese Degradation verhindern, was die Involvierung desselben im Degradationsprozess beweist [102, 103]. Die Translokation

findet durch das Translocon statt. Dieser zylindrische Komplex setzt sich aus drei bis vier Einheiten von Sec61 Heterotrimeren zusammen die einen internen Kanal von 40-60 Å bilden [103]. Die Tatsache, dass das MHC-I-Moleküle mit Hilfe von US2 und US11 durch diesen Kanal aus dem ER in das Zytosol exportiert werden, zeigte erstmalig die Fähigkeit des Translocons, Proteine nicht nur zu im- sondern auch zu exportieren [103].

1.5.3 Inhibierung der Peptid-Translokation/-Beladung

Da der leere, unbeladene MHC-Komplex nicht an die Zelloberfläche exportiert wird, haben einige Viren Strategien entwickelt, den Mechanismus der Peptidbeladung zu verhindern. Neben dem schon erwähnten adenoviralen Protein p19, welches als Tapasin-Kompetitor agiert, sind die Proteine US6 und ICP47 dazu in der Lage, den Transport von zytosolischen Peptiden in das ER zu verhindern (vgl. Abb. 5).

Das mit 9 kD relativ kleine, im Zytosol lokalisierte Protein ICP47 des Herpes Simplex Virus (HSV) ist in der Lage, durch die Inhibierung des TAP-Transporters die unbeladenen MHC-I-Komplexe im ER zurückzuhalten. Sowohl in HSV-infizierten als auch in ICP47 transfizierten Zellen konnte eine Retention von unbeladenen MHC-I-Molekülen im ER nachgewiesen werden [104, 105]. Weitere Experimente zeigten, dass die TAP-abhängige Translokation von markierten Reporterpeptiden durch ICP47 verhindert werden konnte [106]. Mit etwa 50 nM hat ICP47 eine weitaus höhere Affinität zu TAP als die meisten Peptide und kann so die TAP-Bindungsstelle blockieren [107, 108]. Neben dieser Blockade induziert ICP47 eine konformationelle Änderung des TAP-Heterodimers, welche die ICP47-TAP-Bindung stabilisieren könnte und damit eine weitere Bindung von Peptiden an TAP verhindern würde [109].

US6 ist eines der vom humanen Zytomegalievirus kodierten vier US-Gene, die für die Inhibierung der MHC-I-Oberflächenexpression verantwortlich sind [110]. Das US6-Glykoprotein ist im Gegensatz zum zytosolischen ICP47 im ER lokalisiert [96, 110, 111]. Es interagiert direkt mit TAP, da es zusammen mit TAP und dem assemblierten MHC-I-Komplex koimmunopräzipitiert werden kann [110, 111]. Obwohl US6 und ICP47 beide die Binding von ATP an TAP nicht beeinflussen, verhindern sie die ATP-abhängige Translokation via TAP. Im Gegensatz zu ICP47 kann US6 eine Bindung des Peptids an TAP nicht verhindern [110, 111]. Ein Grund hierfür ist sicherlich in der Lokalisation von US6 zu suchen: da die Bindungsstelle des Peptids auf der zytoplasmatischen Seite von TAP lokalisiert ist, ist sie für US6 unerreichbar. So ist der genaue Wirkungsmechanismus der Inhibierung des Peptidtransports durch US6 noch unklar. Denkbar wäre eine Konformationsänderung von TAP nach der Bindung an US6, die den Peptidtransporter inaktiviert.

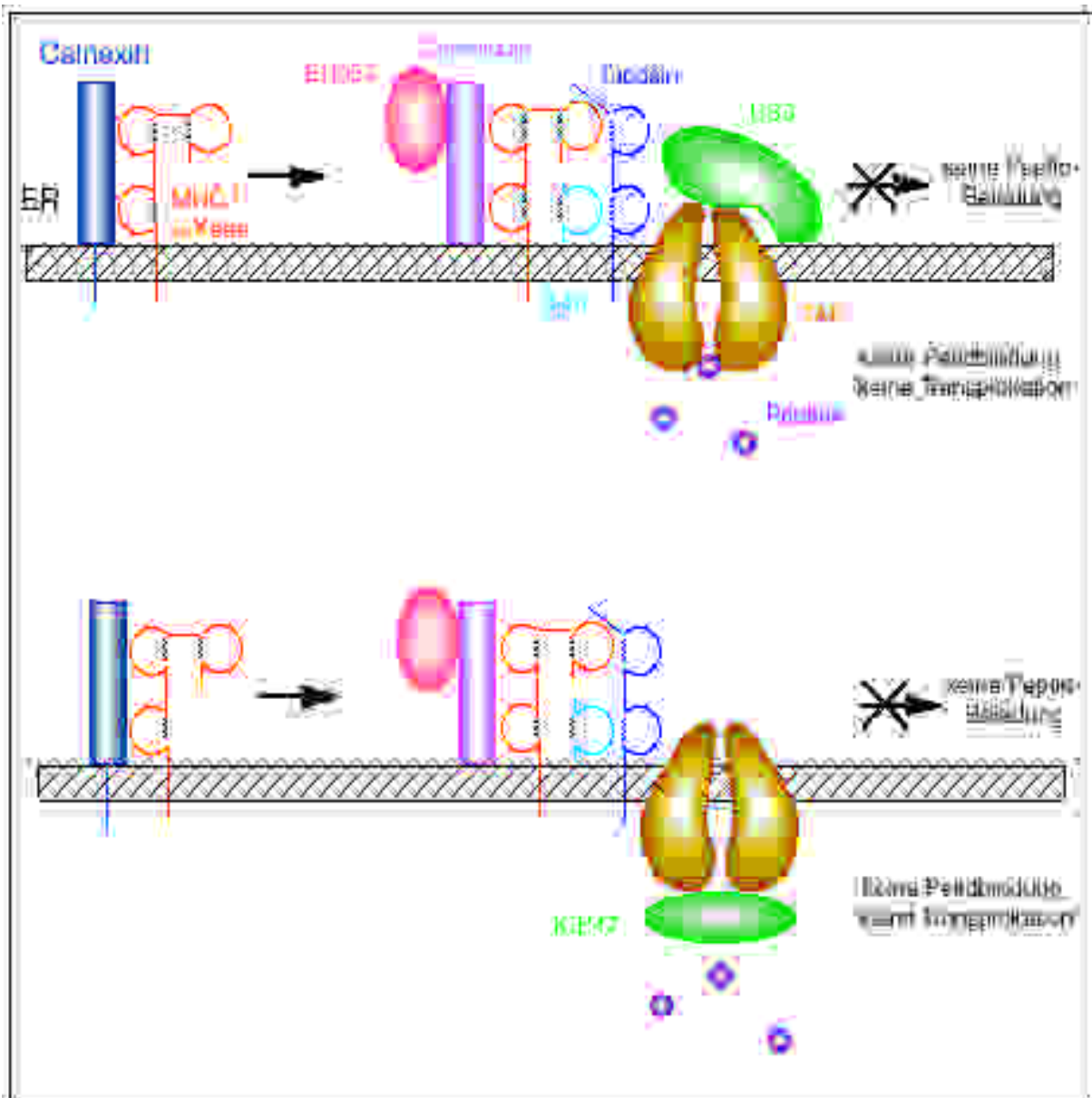


Abb. 5: TAP-Inhibierung durch US6 und ICP47. Leere assemblierte MHC-I-Moleküle bilden einen Komplex mit Tapasin/TAP, da der Peptidtransport via TAP inhibiert ist. a) US6 assoziiert mit dem luminalen Teil von TAP und inhibiert so die Peptidtranslokation. Die Bindung der Peptide an die zytoplasmatische Domäne von TAP wird nicht beeinträchtigt. b) Im Gegensatz dazu inhibiert ICP47 die Peptidtranslokation durch Bindung an die zytoplasmatische Domäne von TAP.

1.6 Tissue Engineering: Herstellung von Gewebeverbänden *in vitro*

Das Problem von *in vitro*-generierten autologen Transplantaten ist ein sowohl zeit- und kostenintensiver Prozeß. Daher ist die Generierung von Geweben, z.B. zur Abdeckung von Hautdefekten Brandverletzter, nicht für jeden Patienten aus autologem Material möglich, so daß auf allogene künstliche Gewebe zurückgegriffen werden könnte.

1.6.1 Was ist Tissue Engineering?

Tissue Engineering stellt einen sich neu entwickelnden, biotechnologischen Forschungszweig dar, der sehr starke Verbindungen zu den klinischen Fachrichtungen der Medizin besitzt und als eine Weiterentwicklung der Transplantationsmedizin angesehen werden kann. Der Begriff "Tissue Engineering" wurde zuerst 1987 von der Washington National Science Foundation Bioengineering Kommission eingeführt [112]. Er bezieht sich auf die Anwendung der Methoden und Prinzipien des Ingenieurwesens (engineering) zur Entwicklung von biologischen Ersatzmaterialien. Zum Einsatz kommen dabei lebende Zellen in Kombination mit natürlichen oder synthetischen extrazellulären Komponenten. Es werden sowohl einfache Zellkulturen als auch in zunehmendem Maße komplexere, dreidimensionale Zellsysteme *in vitro* entwickelt, die für den Ersatz menschlicher Gewebe und Organe geeignet sind.

Gewebe bzw. Organe, die durch Tissue Engineering generiert werden, umfassen Herz, Leber, Haut, Gefäße (Endothelialisierung), Nervengewebe, Muskel, Knochen und Knorpel.

Die Transplantation *in vitro* gezüchteter Hautstücke ist derzeit noch die weitverbreiteste Anwendung des Tissue Engineering [113, 114]. Am weitesten fortgeschritten ist die Herstellung von vitalem Hautersatz für Patienten mit schweren Verbrennungen. Es folgt die Generierung von patienteneigenen Knorpeltransplantaten bei Verletzungen bzw. Veränderungen der Gelenkoberflächen oder bei notwendigen Operationen im Hals-, Nasen- und Ohrenbereich [115-117]. Weitere Einsatzgebiete sind die Entwicklung artifizierender Leberorganoide auf der Basis kultivierter Hepatozyten zur Überbrückung von Komazuständen [118, 119], die Transplantation von Inselzellen zur Rekonstitution defekter Hormonproduktion bei Diabetes mellitus [120], der Einsatz von Neuronen in der Zelltransplantation bei Patienten mit Parkinson-Syndrom [121, 122] oder die Endothelialisierung künstlicher Bypässe [123].

1.7 Tissue Engineering der Haut - ein potientiellles Einsatzgebiet für MHC-I-modifizierte Epithelzellen?

Die Haut ist mit fast zwei Quadratmetern Fläche das größte Organ des Menschen und ist entscheidend für die Aufrechterhaltung des internen Milieus des Körpers. Neben der Funktion als Schutzmantel fungiert sie als Schaltstelle zwischen dem Inneren und unserer Umwelt.

Menschliche Haut besteht aus verschiedenen Zelltypen, die untereinander in Wechselwirkung stehen: die formgebende Unterhaut (Dermis) enthält überwiegend Fibroblasten, welche die Makromoleküle der extrazellulären Matrix produzieren. Die extrazelluläre Matrix enthält eine Vielzahl anderer Zellen und Strukturen - u.a. Makrophagen, Leukozyten, Endothelzellen, Nervenaxone, Melanozyten, Haarfollikel sowie Schweiß- und Talgdrüsen. Oberhalb der Dermis liegt eine Schicht teilungsfähiger Keratinozyten, die Basalzellen. Durch Teilung dieser Basalzellen entsteht ein mehrschichtiges Epithel, die Epidermis. Neben den Keratinozyten sind in der Epidermis außerdem noch Melanozyten, Merkel-Zellen und Langerhans-Zellen enthalten. Melanozyten produzieren den Farbstoff Melanin und sind für die Pigmentierung der Haut verantwortlich, welche sie vor Schäden durch ultraviolettes Licht schützt. Merkel-Zellen sind mit Nervenenden der Epidermis assoziiert und an der sensorischen Wahrnehmung durch die Haut beteiligt. Die antigenpräsentierenden Langerhans-Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei der Kontakt-Sensitivität. Die Hauptrolle spielen jedoch die Keratinozyten. Sie sind der zahlenmäßig dominierende Zelltyp der Epidermis, produzieren Keratin und zeigen eine ausgeprägte Differenzierung. Je weiter die Keratinozyten durch Teilung an die Hautoberfläche gelangen, desto stärker verändern sie ihre Struktur und Funktion. Sie sind die strukturgebenden Elemente der Epidermis.

Spalthaut (netzförmig geschnittene Eigenhaut zur Oberflächenvergrößerung) steht oft nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung und hinterläßt außerdem neue Wundflächen und Narben. Xenograft-, Allograft- oder synthetische Wundabdeckungen sind wegen der Abstoßungsreaktionen nur vorübergehend geeignet, bis genügend eigene Keratinozyten (nach ca. drei Wochen) gezüchtet worden sind. Der erste Versuch, Haut für den Einsatz in der Transplantation zu modifizieren, bestand in der Entfernung der antigenpräsentierenden Langerhans-Zellen. Ziel war es, die Transplantaterkennung auf den direkten Weg zu beschränken. Langerhans-Zellen können Antigene (vor allem MHC-I-Antigene) aufnehmen und sie im Kontext mit MHC-II-Antigenen sensibilisierten, durch das Entzündungsmilieu angelockten, T-Zellen im Transplantat präsentieren. Darüber hinaus könne sie mit den

aufgenommenen allo-Antigenen zu den drainierenden Lymphknoten migrieren und dort als potente antigenpräsentierende Zellen eine Primärimmunantwort auslösen.

Eine verminderte allogene Immunogenität wurde jedoch nur bedingt beobachtet: die Transplantate wurden nach etwa 15 Tagen abgestoßen, etwa fünf Tage später, als allogene Spalthaut [124, 125]. Bereits elf Tage nach Transplantation konnte die Infiltration von Monozyten und Lymphozyten im Transplantat nachgewiesen werden [125]. Die Ursache dieser Abstoßungsreaktion war die Migration von autologen Langerhans-Zellen in das Transplantat, welche die Alloantigene präsentierten.

Durch Tissue Engineering hergestellte Haut könnte entweder als Hautersatz fungieren, als Matrixgrundlage, in welche die Zellen des Empfängers einwandern und sich dort ansiedeln könnten oder als Lieferant von heilungsfördernden Faktoren. Diese pharmakologische Wirkung kann durch Hauttransplantate erzielt werden, die lebende Zellen enthalten, welche Zytokine oder unlösliche Matrixproteine wie Kollagen produzieren. Generell können die durch Tissue Engineering hergestellten Hauttransplantate in vier Kategorien aufgeteilt werden: a) epidermale Transplantate, b) dermale Transplantate, c) Transplantate bestehend aus Dermis und Epidermis und d) Transplantate, die aus einer Kombination von künstlicher Dermis und lebenden epidermalen Zellen bestehen. Es gibt bereits eine Vielzahl kommerziell erhältlicher Produkte für die Hauttransplantation [zusammengefasst in 113, 114, 126-128]. Um aufzuzeigen, wo MHC-I-modifizierte Keratinozyten in der Praxis eingesetzt werden könnten, werden einige dieser Produkte nachfolgend beschrieben.

1.7.1 Tissue Engineering der Epidermis

Keratinozyten können in speziellen Wachstumsmedien in Kokultur mit bestrahlten murinen 3T3-Fibroblasten *in vitro* über mehrere Passagen hinaus kultiviert werden [129, 130]. Bei Verwendung von Keratinozyten aus fetaler Haut konnten ca. 50-60 Zellteilungen erreicht werden. Diese Anzahl sinkt mit dem Alter des Spenders [131]. "Übersetzt" man die Anzahl an erreichten Zellteilungen in Hautfläche, so können Keratinozyten zu einer Fläche expandiert werden, die bis zu 10.000 mal größer ist, als das zuvor entnommene Gewebe. So lassen sich aus einem Quadratzentimeter Hautgewebe von einem schwer verbrannten Patienten nach zwei bis drei Wochen im Extremfall ein Quadratmeter große, neue Hautstücke züchten, die, ins Gewebe des Patienten verpflanzt, später einheilen. Der Einsatz kultivierter Epidermis ist zu einer Standardmethode bei der Behandlung von Verbrennungen und chronischen Wunden geworden [132-136], obwohl die Methode eine Reihe von Nachteilen zeigt: langer Kultivierungszeitraum, schwierige Handhabung und Pflege, unsichere Einheilung und hohe Kosten sind hierbei hervorzuheben.

Eine sehr neue Methode besteht in der Verwendung von Haarwurzeln als Ausgangsmaterial [137]. Dazu werden dem Patienten zwischen 50 und 100 Haare mit Stammwurzeln entnommen, die dann in speziellen Kulturen in vier Wochen zu transplantierbarer Haut heranwachsen. Diese kann dann auf die Wunde aufgebracht werden. Besonders bei älteren Patienten mit chronischen Wunden ist diese Behandlungsmethode erfolgreicher als die bisher angewendete Methode, bei der Patienten gesundes Hautgewebe entnommen und auf die nicht heilende Wunde aufgelegt wurde. Bei den bisher behandelten Patienten lag die Erfolgsquote bei etwa 80 Prozent.

Allogene Keratinozyten stellen eine sofort verfügbare Alternative zu autologen Transplantaten dar. Als Quelle hierfür eignen sich fetale Keratinozyten. Zellen fetalem Ursprungs sind weniger immunogen [138-140] und haben eine hohe Teilungsrate im Gegensatz zu Keratinozyten erwachsener Menschen. Bei der Transplantation allogener "Keratinozyten-Sheets" konnte keine klinische Rejektion nachgewiesen werden; die Zellen überleben jedoch nicht, sondern werden bereits nach einer Woche "still" durch die Keratinozyten des Empfängers ersetzt [140-148]. Diese transplantierten "Keratinozyten-Sheets" fungieren also nicht als Gewebe-Transplantat, sondern eher - durch von den Keratinozyten sezernierte heilungsfördernden Faktoren - als ein potenter Stimulus des Heilungsprozess. Daher sind sie bei großflächigen Verbrennungen oft eine gute Alternative zu den zeitintensiven autologen "Keratinozyten-Sheets". Bei der Verwendung fetaler Keratinozyten zu Züchtung von Haut muss jedoch bedacht werden, daß gegen die Gewinnung von embryonalem Material und dessen Einsatz in der Transplantationsmedizin unter verschiedenen Gesichtspunkten rechtliche und ethische Bedenken bestehen.

1.7.2 Tissue Engineering der Dermis

Kultivierte epidermale Transplantate sind wesentlich effektiver, wenn sie auf einer dermalen Schicht kultiviert und transplantiert werden, da so die Stabilität verbessert wird und damit der Wundheilungsprozess positiv beeinflusst wird. Die dermale Komponente hat einen positiven Einfluß auf die Migration, Differenzierung, Anheftung und Wachstum epithelialer Zellen [149-151].

Das unter der Bezeichnung Alloderm (Life Cell Sciences) kommerziell vertriebene dermale Transplantat besteht aus chemisch prozessierter, dezellularisierter Leichenhaut. Nach Entfernung aller lebenden Zellen und der Epidermis bleibt ein komplexes Netzwerk zurück, das viele strukturelle Komponenten der Dermis enthält. Die Anwendungsgebiete für dieses von der FDA (Food and Drug Administration, USA) zugelassene Transplantat liegen heute in der Behandlung von Verbrennungen, Hautkrankheiten, sowie in der zahnärztlichen Chirurgie [152].

Die Vorteile der kultivierten epidermalen Transplantate liegen zum einen in der Möglichkeit der starken Expansion der Ausgangszellzahl aus wenig Material mit befriedigendem biomechanischen und kosmetischen Resultaten, zum anderen in dem geringen Risiko bei der Übertragung von Viruserkrankungen. Nachteile sind vor allem die Instabilität des Transplantats (hohe Anfälligkeit gegenüber Scherkräften und Druck, z.B. bei Transplantation im Rücken-, Schulter-, Gesäß- oder hinterem Oberschenkelbereich) [153], die schlechte Verheilung durch Wundkontraktionen [154, 155], die hohen Produktionskosten der Zellkultur und die schlechte Anwendbarkeit bei tiefen Wunden.

1.7.3 Tissue Engineering von kombinierter Dermis und Epidermis

Zwei Hautäquivalente aus kombinierter Dermis und Epidermis, die heute verbreitet als Wundabdeckungen von Brandwunden eingesetzt werden sind Integra (Integra) und Dermagraft-Transitional Covering (Dermagraft-TC).

Integra basiert auf der Entwicklung einer zweischichtigen Membran von Yannas und Burke [156-158]. Sie besteht aus einer äußeren "epidermalen" Silikonschicht, die mit einer inneren Dermalschicht verbunden ist. Die Dermalschicht setzt sich aus einem porenförmigen Netzwerk aus Kollagen und Glukosaminoglykanen zusammen. Die obere Silikonmembran verhindert das Einwandern von Bakterien in die Wunde und einen Wasserverlust des Gewebes. Die innere dermale Schicht fördert ein gutes Anwachsen des Transplantats, indem die porenförmige Struktur eine langsame Biodegradation, Vaskularisierung sowie die Migration von Empfängerzellen zulässt. Einige Wochen nach Transplantation, wenn eine fibrovaskuläres Einwachsen in die dermale Schicht stattgefunden hat, muss die äußere Silikonschicht entfernt werden. Danach kann eine sehr dünne Spalthaut transplantiert werden.

Dermagraft-TC ist eine Weiterentwicklung des Hauttransplantats von Integra. Auch hier besteht die äußere Schicht aus einer Silikonmembran. Die innere dermale Schicht wird von humanen fetalen Fibroblasten synthetisiert, die auf einem aus Nylon bestehenden Netzwerk kultiviert werden. Nachdem die Fibroblasten eine dermale Matrix aus Glucosaminglycanen und Kollagen produziert haben, werden sie durch Einfrieren abgetötet, so dass nur noch die dermale Komponente in der Transplantation eingesetzt wird [159].

Vorteile dieser Präparate sind die schnelle Verfügbarkeit (gegenüber epidermalen Autotransplantaten), die immunologische Neutralität durch Dezellularisierung, dem besseren optisch-kosmetischen Resultat und der schnelleren Heilung gegenüber Spalthaut, der einfacheren Handhabung als der von epidermalen Allo-/Autotransplantaten, dem geringen Risiko von Virusübertragungen und die mögliche Repopularisierung durch Empfängerzellen.

Nachteile sind die schlechtere Akzeptanz des Transplantats gegenüber Eigenspalthaut oder epidermalen Autotransplantaten, die Notwendigkeit einer zweiten Transplantation nach Entfernung der Silikonschicht, die erst späte Detektion von Infektionen unter der Silikonschicht und den relativ hohen Produktionskosten. Spezielle Nachteile bei der Verwendung von Dermagraft-TC liegen in der Notwendigkeit der Haltbarmachung durch Preservationsmittel und der möglichen Übertragung von Viren. Außerdem stellt auch hier die Verwendung von Kadaverhaut, wie die von fetalen Zellen in epidermalen Allotransplantaten, für viele Menschen ein ethisches Problem dar.

1.7.4 Tissue Engineering mit Einsatz lebender Zellen: "Living Skin Equivalents"

Anstelle der äußeren Silikonmembran können allogene fetale Fibroblasten in das biologisch abbaubare Polyglaktinnetzwerk von Dermagraft-TC eingesät und die temporäre Wundabdeckung kann damit als "lebendes" Hautäquivalent fungieren [132]. Für chronische Erkrankungen wie diabetische Ulzera ist dies durchaus praktikabel (im Gegensatz zu akuten Verbrennungen, bei denen oft nicht sofort genügend autologes Material zur Verfügung steht).

Ein weiteres Hautäquivalent, das lebende Zellen enthält, ist Apligraf (Organogenesis). Es setzt sich aus bovinem Kollagen und humanen fetalen Fibroblasten und Keratinozyten zusammen, die Wachstumsfaktoren und Matrixproteine produzieren und somit den Heilungsprozeß fördern. Einsatzgebiet für Apligraf sind vor allem venöse oder diabetische Ulzera [160]. Bei einer großangelegten Studie in den USA, in der 293 Patienten mit venösen Ulzera über den Zeitraum von einem Jahr beobachtet wurden, zeigte der Einsatz von Apligraf bei schweren Fällen gegenüber der konventionellen Kompressionstherapie gute Ergebnisse. Bei großen und tiefen Ulzera, sowie bei persistierenden (länger als sechs Monate) Geschwüren wurde eine komplette Schließung der Wunde bei mehr Patienten gegenüber der Kontrollgruppe erreicht (63% vs. 49%) und dies wesentlich schneller (61 vs. 181 Tage). Bei weniger als sechs Monate anhaltenden Ulzera zeigten beide Gruppen jedoch ähnliche Ergebnisse [160].

Vorteile beim Einsatz dieser mit vitalen Zellen kombinierten Transplantate liegen in der sofortigen Verfügbarkeit, der leichten Handhabung und der Tatsache, dass eine Re- oder Zweittransplantation nicht notwendig ist. Nachteile liegen in der Möglichkeit von Virusübertragungen, sowie dem limitierten Zeitrahmen zwischen Fertigstellung des Transplantats und Transplantation desselben (Viabilität: 5 Tage). Wie bei anderen allogenen Transplantaten ist auch hier die ethische Problematik des Einsatzes fetaler Zellen zu erwähnen. Darüber hinaus ist die Verwendung von bovinem Material in Deutschland nicht zugelassen.

1.8 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollten allogene Keratinozyten bezüglich ihrer MHC-I-Expression modifiziert werden, um ihre Immunogenität zu senken und sie im Bereich des Tissue Engineerings für einen transplantierbaren Hautersatz potentiell einzusetzen. Dieses Prinzip wäre dann übertragbar auf andere Zellen bzw. Gewebe.

Zu diesem Zweck sollten primäre, anti-MHC-I-Intrabody-exprimierende Keratinozyten generiert werden. Ziel dieser Intrabody-Expression war eine Verminderung der MHC-I-Expression auf der Zelloberfläche. Das Potential der Intrabodies, eine Senkung der MHC-I-Oberflächenexpression zu bewirken, sollte im Vergleich mit anderen MHC-I-"downregulatorischen" Proteinen, wie dem adenoviralen p19-Protein untersucht werden. Darüber hinaus sollte die Funktionalität der Intrabodies unter proinflammatorischen Bedingungen, z.B. in der Gegenwart von Interferon- γ , untersucht werden. Die modifizierten Keratinozyten dürften sich morphologisch und physiologisch nicht von untransfizierten Zellen unterscheiden. Des Weiteren sollten die Zellen bezüglich ihrer intrazellulären Anzahl an MHC-I-Molekülen untersucht werden, um den Wirkungsmechanismus der Intrabodies näher zu charakterisieren. Funktionell sollten zytotoxische T-Zellen gegenüber Intrabody-exprimierenden, MHC-I-defizienten Keratinozyten eine geringere lytische Aktivität zeigen als gegen untransfizierte Zellen. Das finale Ziel des Einsatzes Intrabody-exprimierender Keratinozyten war die Generierung transplantierbarer Hautstücke, die im Rattentransplantationsmodell eingesetzt werden sollten.

2 Material

2.1 Allgemeine technische Geräte

Autoklav

Eismaschine *AF-10*

Gefrierschränke

Glaswaren

Kühlschränke

pH-Meter *PHM 62*

Pipetten

Pipettierhilfe *Pipetboy plus*

Feinpipetten *Research*

Einwegpipetten (5ml, 10 ml, 25 ml)

Einweg-Pasteurpipetten

Schüttelinkubator *Thermostat 5320*

Schüttler, Vortex *MS2 Minishaker*

Waagen

Wasserbad

Gössner, Hamburg

Scotsman, Mailand, Italien

Bosch, Stuttgart

Schott, Mainz

Liebherr, Ochsenhausen

wiss.-techn. Werkstätte, Weilheim

Tecnomara/Integra Biosciences, Fernwald

Eppendorf, Hamburg

Greiner, Nürtingen

Greiner, Nürtingen

Eppendorf, Hamburg

IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen

Sartorius, Göttingen

GFL, Burgwedel

2.2 Geräte und Material für die Zellkultur

24-Well Multischalen

6-Well Multischalen

96-Well Rundbodenplatten

Bestrahlungsanlage *Gamma Cell 40*

Durchflußzytometer *FACSort*

Einfrierröhrchen

Fluoreszenzmikroskop

Fluorimeter *Spectrafluor*

Glas-Petrischalen

Inkubationsschränke

Kulturflaschen (50 ml, 250 ml)

Lichtmikroskop

Magnetpartikelkonzentrator *MPC-1*

Falcon, Oxnard, USA

Falcon, Oxnard, USA

Nunc, Roskilde, Dänemark

Atomic Energy, Mississauga, Canada

Becton Dickinson, San Jose, USA

Nunc, Roskilde, Dänemark

Nikon, Tokyo, Japan

Tecan, Crailsheim

Nunc, Roskilde, Dänemark

Jouan, Unteraching

Falcon, Oxnard, USA

Nikon, Tokyo, Japan

Dynal, Oslo, Norwegen

Neubauer Zählkammer

Potter

Sterilwerkbänke

Stickstofftanks

Zellkulturschalen (10 cm und 14 cm Durchmesser)

Zellschaber

Zellsiebe, 40 und 100 µm Porendurchmesser

Zentrifugen

Biofuge Fresco

Centrikon T-324

Centrifuge 5402

Megafuge 1.0

Fein-Optik, Blankenburg

Kontes Glass Co., Vineland, NJ, USA

Heraeus, Hanau

Taylor-Wharton, Theodore, AL, USA

Falcon, Oxnard, USA

Falcon, Oxnard, USA

Becton Dickinson, San Jose, USA

Heraeus, Hanau

Kontron, Neufahrn

Eppendorf, Hamburg

Heraeus, Hanau

2.3 Geräte und Material für die Molekularbiologie und Biochemie

96-Loch Flachbodenplatten für die Fluorimetrie

Autoradiographiekassette

Blotting-Apparatur *Semidry-Blotter (Fastblot)*

Chromatographie-Säule

Elektrophoresekammer, horizontal & Zubehör

Gel-Imager & *E.A.S.Y. Enhanced Analysis System*

Heizblock

Heizrührer 502

Mikrowellengerät

Minigel-System für SDS-PAGE

(Glasplatten, Abstandshalter, Kämme)

RNA/DNA Kalkulator GeneQuant II

Spannungsgerät Consort 835

Termocycler 9600

Termocycler 9700

Vakuum-Zentrifuge Concentrator 5301

Dynatech Laboratories Ltd., Sussex, GB

Amersham Buchler, Braunschweig

Biometra, Göttingen

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Renner GMBH, Dannstadt

Herolab, Wiesloh

Kleinfedt Labortechnik Berlin

Neolab, Heidelberg

Bosch, Stuttgart

Biometra, Göttingen

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

AGS, Heidelberg

Perkin Elmer, Branchburg, USA

Perkin Elmer, Branchburg, USA

Eppendorf, Hamburg

2.4 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid Lösung 30%

Agar

Agarose

Ammoniumpersulfat (APS)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Gibco BRL, Gaithersburg, USA

Gibco BRL, Gaithersburg, USA

Merck, Darmstadt

| | |
|--|---------------------------------------|
| Ampicillin | Merck, Darmstadt |
| b-Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt |
| Bactotrypton | DIFCO, Detroit, USA |
| Borsäure | Merck, Darmstadt |
| Bovines Serum Albumin (BSA) | Sigma, Steinheim |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| Cäsiumchlorid | Sigma, Steinheim |
| Chloroquine | Sigma, Steinheim |
| Choleratoxin | Sigma, Steinheim |
| Dextransulfat MW 500.000 | Fluka, Steinheim |
| Di-Kaliumhydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| Diethyl-Pyrocarnat (DEPC) | Sigma, Steinheim |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Serva, Heidelberg |
| DMRIE-CTM (1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethyl-hydroxy ethyl ammonium | Life Technologies, Rockville, MA, USA |
| DTPA (Diethylentriamin-pentaessigsäure) | Aldrich, Steinheim |
| Dulbeco's MEM | Biochrom, Berlin |
| EN ³ HANCE-Lösung | NEN Life Science, Boston, USA |
| Enhancement-Solution DELFIA, Verstärker-Lsg. für Europium | Wallac, Turku, Finnland |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Baker Analyzed, Deventer |
| Ethidiumbromid | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Ethyldiamin-Tetraessigsäure-Na-Salz (EDTA) | Sigma, Steinheim |
| Europiumchlorid | Sigma, Steinheim |
| fetales Kälberserum (FKS) | Seromed, Berlin |
| Genitacin (G-418 Sulfat) | Gibco-BRL, Gaithersburg, USA |
| Glasmilch, RNaid | Bio101, Carlsbad, CA, USA |
| Glukose | Sigma, Steinheim |
| Glycerol | Serva, Heidelberg |
| Guanidiniumthiocyanat | Gibco-BRL, Gaithersburg, USA |
| Hams F 12 | Biochrom, Berlin |
| Hefeextrakt | Merck, Darmstadt |
| HEPES-Puffersubstanz | Sigma, Steinheim |
| Hydrocortison | Sigma, Steinheim |
| Insulin | Sigma, Steinheim |
| Interleukin-2, rekombinant | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| Isopropanol | Baker Analyzed, Deventer |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |

| | |
|--|--------------------------------------|
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck, Darmstadt |
| L-Glutamin | Sigma, Steinheim |
| Lipofectamin | Gibco BRL, Gaithersburg, USA |
| Magermilchpulver | Becton Dickinson, San Jose, USA |
| Magnesiumchlorid | Baker Analyzed, Deventer |
| Marker, DNA-, 1kb | Gibco-BRL, Gaithersburg, USA |
| Marker, Protein-, multicolored wide range 6,5-205 kD | NEN Life Science, Boston, USA |
| Maus-EGF | R&D Systems GmbH, Wiesbaden |
| N,N,N',N'-Tetraethyldiamin (TEMED) | Serva, Heidelberg |
| N-Lauroylsarcosin | Sigma, Steinheim |
| N6-Monomethyl-L-Arginin-Monoazetat (L-NMMA) | Alexis Corporation, San Diego, USA |
| Natriumacetat-3-hydrat | Merck, Darmstadt |
| Natriumazid | Sigma, Steinheim |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Natriumcitrat-2-Hydrat | Merck, Darmstadt |
| Natriumdeoxycholat | Sigma, Steinheim |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) | Serva, Heidelberg |
| Natriumhydrogencarbonat | Merck, Darmstadt |
| Natriumpyruvat | Seromed, Berlin |
| Natronlauge, 1 M [NaOH] | Merck, Darmstadt |
| Noble-Agar | Sigma, Steinheim |
| Nonidet P-40 | Sigma, Steinheim |
| Olinukleotide, synthetisch | metabion, Martinsried |
| OPTI-MEM™ | Gibco-BRL, Gaithersburg, USA |
| Pancoll Rat | PAN Biotech, Aidenbach |
| Paraformaldehyd | Sigma, Steinheim |
| Penicillin-Streptomycin | Gibco BRL, Gaithersburg, USA |
| Phenol, Tris-gesättigt | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |
| Phenylmethylsulfonsäure (PMSF) | Calbiochem, San Diego, USA |
| Piperazin-N,N'-bis-Ethansulfonsäure (PIPES) | Sigma, Steinheim |
| Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20) | Serva, Heidelberg |
| Protein-A Sepharose | Boehringer, Mannheim |
| RPMI 1640 | Biochrom, Berlin |
| RPMI 1640, ohne Cystein | Gibco-BRL, Gaithersburg, USA |
| Salzsäure (HCL) | Merck, Darmstadt |
| Sephadex G25 | Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden |
| Silica (Silikon Dioxid) | Sigma, Steinheim |
| Superfect™ | Qiagen, Hilden |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base) | Merck, Darmstadt |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg |
| Xylencyanol | Serva, Heidelberg |

Zeocin™

Radioaktive Chemikalien

³⁵S-Cystein

³⁵S-Methionin

Invitrogen, Leek, Niederlande

Amersham Buchler, Braunschweig

Amersham Buchler, Braunschweig

2.5 Enzyme

DNA-Polymerase, *Vent*™-Polymerase,

ThermoPol Buffer

DNA-T4-Ligase

MMLV-Reverse Transkriptase, First strand buffer, DTT

Restriktionsenzyme

Ribonuklease A

Ribonukleaseninhibitor (*RNA*sin)

Streptavidin-Peroxidase (-POD)

New England Biolabs, Beverly, MA, USA

Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden

Gibco-BRL, Gaithersburg, USA

New England Biolabs, Beverly, MA, USA

Boehringer, Mannheim

Promega, Madison, USA

Sigma, Steinheim

2.6 Versuchssysteme ("Kits")

Gel-Extraktions-Kit *Jetquick*

in vitro Translationskit *TNT*™

Kit für intrazell. FACS Färbungen *Cytofix/Cytoperm*

Plasmid-Präparations-Kit *JetStar*

Ribonuklease A

GENOMED, Bad Oeynhausen

Promega, Madison, USA

PharMingen, Hamburg

GENOMED, Bad Oeynhausen

Boehringer, Mannheim

2.7 Zelllinien

293, humane embryonale Nierenepithelzellen

COS-1, Affen-Nierenfibroblasten

F16-4-4-11, Hybridom (anti-RT1.A)

NBT-II, epitheliale Ratten-Tumorzellen

NRK-52E, epitheliale Ratten-Tumorzellen

OX-18, Hybridom (anti-RT1.A)

DSMZ, Braunschweig

ATCC, Rockville, MA, USA

ECACC, Oxford, England

DSMZ, Braunschweig

DSMZ, Braunschweig

ECACC, Oxford, England

2.8 Antikörper

| Spezifität | Klon | Markierung | Isotyp | Quelle |
|-----------------|------------|------------|-----------|------------------------------|
| CD46, human | 122-2 | - | Maus IgG1 | Dianova, Hamburg |
| CD49b, human | AK 7 | - | Maus IgG1 | Dianova, Hamburg |
| CD49d, human | 44H6 | - | Maus IgG1 | Dianova, Hamburg |
| CD58, human | BRIC 5 | - | Maus IgG1 | Dianova, Hamburg |
| ICAM-1, Ratte | 1A/27 | - | Maus IgG1 | BD/PharMingen, SanDiego, USA |
| pan-HLA-A,-B,-C | G46.2.6 | FITC | Maus IgG1 | BD/PharMingen, SanDiego, USA |
| pan-HLA-A,-B,-C | G46.2.6 | PE | Maus IgG1 | BD/PharMingen, SanDiego, USA |
| pan-HLA-A,-B,-C | G46.2.6 | - | Maus IgG1 | BD/PharMingen, SanDiego, USA |
| pan-RT1.A | OX-18 | - | Maus IgG1 | BD/PharMingen, SanDiego, USA |
| pan-RT1.A | F16-4-4-11 | - | Maus IgG1 | ECACC, Oxford, England |
| pan-RT1.B | OX-6 | - | Maus IgG1 | BD/PharMingen, SanDiego, USA |

2.9 Rattenstämme

DA, Haplotyp: RT1avl

M&B A/S, Dänemark

Lewis, Haplotyp: RT1l

M&B A/S, Dänemark

2.10 Bakterienstämme

| | | |
|----------------|---|---------------------------|
| SCS110 | <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT</i> <i>ara tonA tsx dam dcm supE44</i> (lac-proAB) [F' <i>traD36 proAB lacI^q ZΔM15</i>] | Stratagene, La Jolla, USA |
| SURE | <i>e14⁻(McrA⁻) (mcrCB-hsdSMR-mrr) 171</i> <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB</i> <i>recJ sbcC umu::Tn5(Kan^r) uvrC</i> [F' <i>proAB lacI^q</i> <i>Z M15 Tn10(Tet^r)</i>] | Stratagene, La Jolla, USA |
| XL-1 Blue MRF' | <i>(mcrA) 183 (mcrCB-hsdSMR-mrr) 173</i> <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q/Z M15 Tn10(Tet^r)</i>] | Stratagene, La Jolla, USA |

2.11 Expressionsvektoren

| Plasmid | Promoter | Selektionsmarker | | Herkunft |
|------------------|---------------------|------------------|----------------|---------------------------------|
| | | Säugetier | <i>E. coli</i> | |
| pACC | CMV | - | Amp | Dr. Kolls, New Orleans, USA |
| pcDNA3.1 | CMV | Neo | Amp | Invitrogen, Leek, Niederlande |
| pcDNA3.1-Zeo (+) | CMV | Zeo | Amp, Zeo | Invitrogen, Leek, Niederlande |
| pCMV-F105GPI | CMV | Neo | Amp | Si Chen, Boston, USA |
| pEGFP-N2 | CMV | Neo | Amp, Kan | CLONTECH, Palo Alto, USA |
| pIRES-EGFP | CMV | Neo, EGFP | Amp | CLONTECH, Palo Alto, USA |
| pJM17 | (Ad5 Helferplasmid) | | | Amp Dr. Kolls, New Orleans, USA |

2.12 Allgemeine Plastikwaren

| | |
|---|-----------------------------|
| Einwegpipetten | Greiner, Nürtingen |
| Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml) | Greiner GmbH, Frickenhausen |
| Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml) | Falcon, Oxnard, USA |
| Polystyrolröhrchen (10 ml), | Greiner GmbH, Frickenhausen |
| Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml) | Eppendorf, Hamburg |

2.13 Sonstiges Verbrauchsmaterial

| | |
|-------------------------------------|------------------------------|
| 3MM-Whatman-Papier | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Nitrozellulose-Membran | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Röntgenfilm | Kodak, Chalon, Frankreich |
| Röntgenfilmentwickler und -fixierer | Kodak, Chalon, Frankreich |
| Sterilfilter (0,2 µm, 0,45 µm) | Schleicher & Schuell, Dassel |

2.14 Allgemein verwendete Puffer

PBS

8 g NaCl
0,2 g KCl
1,44 g Na₂HPO₄
0,24 g KH₂PO₄
in 1 l Aqua dest., pH 7,4

DEPC Wasser

0,5 ml DEPC
ad 500 ml H₂O
schütteln und autoklavieren

50xTAE

2 M Tris-Base
0,05 M EDTA
mit Essigsäure auf pH 8,0

10× TBE

0,89 M Tris-Base
0,89 M Borsäure
0,02 M EDTA

DNA-Probenpuffer

5 ml Glycerol
1 ml 10× TBE
50 µl 10% Bromphenolblau
50 µl 10% Xylencyanol
4 ml H₂O

2.15 Medien für die Kultur eukaryotischer Zellen

Keratinocytenmedium nach Green

| | |
|-------------------------|----------------|
| 1 mM | Natriumpyruvat |
| 2 mM | L-Glutamin |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 5 µg/ml | Insulin |
| 1 nM | Choleratoxin |
| 0,4 µg/ml | Hydrocortison |
| 10 ng/ml | Maus-EGF |
| 10% | FKS |
| in DMEM/HAM's F12 (3:1) | |

Medium für die Gemischte Lymphozytenkultur

| | |
|--------------|------------------|
| 2 mM | L-Glutamin |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 5 mM | -Mercaptoethanol |
| 1 mM | - |
| 10% | FKS |
| 2% | autologes Serum |
| in RPMI 1640 | |

Medium für den Zytotox-Test

| | |
|--------------|------------------|
| 2 mM | L-Glutamin |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 5 mM | -Mercaptoethanol |
| 10% | FKS |
| in RPMI 1640 | |

Medium für die Kultur von OX-18 und F16-4-4-11 Zellen

| | |
|--------------|--------------|
| 2 mM | L-Glutamin |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 10% | FKS |
| in RPMI 1640 | |

Medium für die Kultur von NBT-II, NRK-52E, COS-1 und 293-Zellen

| | |
|-----------|----------------|
| 2 mM | L-Glutamin |
| 100 U/ml | Penicillin |
| 100 µg/ml | Streptomycin |
| 1 mM | Natriumpyruvat |
| 10% | FKS |
| | in DMEM |

3 Methoden

3.1 Überblick über die Abfolge der angewendeten Methoden

Synthese der MHC-I-"downregulatorischen" Proteinen via PCR [3.2.1]

- a) Ox18sFv, Ox18Fab: anti-Ratten-MHC-I-Intrabody [3.2.1.2 + 3.2.1.1]
- b) 8KsFv: anti-human-MHC-I-Intrabody [3.2.1.4]
- c) p19: Adenovirus E3-Protein p19 [3.2.1.3]



Klonierung der MHC-I-"downregulatorischen" Proteine in Expressionvektoren [3.2.5]

- a) Expression von Gen x allein
- b) bicistronische Vektoren: duale Genexpression von Gen x und GFP
- c) GFP-Fusionsprotein: Fusionsprotein aus Gen x und GFP



Expression der MHC-I-"downregulatorischen" Proteine *in vitro*

- a) in vitro-Translation [3.3.1]
- b) transiente Expression in COS-1 Zellen und 293-Zellen [3.5.4.4 + 3.5.4.1]
- c) stabile Expression in primären Rattenkeratinozyten und diversen Ratten-Zelllinien durch Zeocin- bzw. G418-Selektion [3.5.4.2 + 3.5.5]
- d) Expression durch Adenovirus-Infektion in primären humanen Keratinozyten [3.5.6]



Nachweis der intrazellulären Expression der MHC-I-"downregulatorischen" Proteine

- a) Immunopräzipitation [3.3.2]
- b) indirekter Nachweis über Grünfluoreszenz des GFP-Fusionsproteins bzw. bicistronisch exprimierten GFP im Fluoreszenzmikroskop und Durchflusszytometer



Analytik der Intrabody-exprimierenden Zellen

- a) Quantifizierung der intra- und extrazellulären MHC-I-Expression durch FACS-Analyse [3.4.1 + 3.4.3]
- b) Untersuchung der Expression anderer Oberflächenmoleküle durch FACS-Analyse [3.4.1]



Untersuchung der Immunogenität von Intrabody-exprimierenden Zellen *in vitro*

Zytotoxizitäts-Test mit Rattenkeratinozyten als Targets [3.5.9]



Untersuchung der Immunogenität von Intrabody-exprimierenden Zellen *in vivo*

Generierung von Ratten-Hautstücken aus Primär-Keratinozyten und Transplantation im Rattenmodell [3.5.2 + 3.6]

3.2 Molekularbiologische Methoden

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die Methoden entsprechend den Protokollen molekularbiologischer Handbücher [161, 162] durchgeführt.

3.2.1 Synthese der MHC-I-"downregulatorischen" Konstrukte

Es wurden folgende Konstrukte synthetisiert, mit bzw. ohne KDEL-Retentionssequenz:

- Konstrukte mit/ohne KDEL-Retentionssequenz:
 - bicistronisch exprimierter anti-Ratten-MHC-I-Intrabody: pCMV-Ox18Fab
 - anti-Ratten-MHC-I-Intrabody (single chain): pCMV-Ox18sFv
- GFP-Fusionsproteine in pcDNA3.1-Zeo(+):
 - mit anti-Ratten-MHC-I-Intrabodies: pZeo-Ox18sFvGFP
 - mit anti-human-MHC-I-Intrabodies: pZeo-8KsFvGFP
 - mit Adenovirus p19-Protein: pZeo-p19GFP
- bicistronischer Vektor mit GFP in der zweiten Kassette (backbone: pIRES-EGFP):
 - mit anti-Ratten-MHC-I-Intrabodies: pIE-Ox18sFv
 - mit anti-human-MHC-I-Intrabodies: pIE-8KsFv
 - mit Adenovirus p19-Protein: pIE-p19

3.2.1.1 Ox18Fab-Intrabodies

Ausgangsmaterial für die anti-Ratten-MHC-I-Intrabodies war die mRNA des OX-18 Hybridoms. Zunächst wurde die gesamt-mRNA aus den Zellen präpariert, danach die VHCH1- bzw. VLCL-Domänen des OX-18-Antikörpers mittels PCR amplifiziert und in den bicistronischen Vektor pCMV-F105GPI (vgl.

Abb. 6) [163] mit den Restriktionsenzymen Asc I/Not I und Nhe I/Pac I kloniert.



Abb. 6:

Bicistronischer Expressionsvektor pCMV-F105GPI mit IRES-Sequenz (intraribosomal entry site) für die Expression der zweiten Kassette.

Oligonukleotide für pCMV-Ox18Fab bzw. -Ox18Fab^{KDEL}, Template: OX-18 cDNA

| Primer | Sequenz | Restriktionsstellen | Richtung | Beschreibung |
|--------|---|---------------------|----------|-------------------------|
| A | TACTAGGCGCGCCATGGMTTGGGTGTGGAMC TTGCTATTCCTG | <i>Asc I</i> | for | V _H leader |
| B | TTCATGCGGCCGCCTAACCACAATCCCTGGG CACAAT | <i>Not I</i> | rev | heavy IgG1 Fab |
| C | TACTAGCTAGCATGAAGTTGCCTGTTAGGCT GTTGGTGCTG | <i>Nhe I</i> | for | V |
| D | TCGACTTAATTAATACTAACAATCATTTCCT GTTGAA | <i>Pac I</i> | rev | light kappa Fab |
| E | AATATACTTAATTAATTACAGCTCGTCCTTT TCGCTACACTCATTTCCTGTTGAA | <i>Pac I</i> | rev | light kappa Fab-KDEL |

3.2.1.2 Ox18sFv-Intrabodies

Ausgehend von dem Konstrukt pCMV-Ox18Fab wurden die variablen Domänen reamplifiziert und durch eine Assemblierungs-PCR (vgl. Abschnitt 3.2.4) zusammengefügt. Das Konstrukt wurde anstelle der Fab-Sequenz (inklusive IRES) in den vorhandenen Vektor pCMV-Ox18Fab kloniert.

Ferner wurde das Konstrukt nach zweimaliger Reamplifikation mit den Primern A+J und A+K in den Vektor pIE-8KsFv kloniert, welcher in der zweiten Kassette das "Enhanced Green Fluorescent Protein" (EGFP) zur Visualisierung und Selektion exprimierender Zellen enthält. Dabei wurden die Sequenzen für das myc-Epitop (zur Detektion des Proteins durch entsprechende Antikörper) und die KDEL-Retentionssequenz eingeführt.

Des Weiteren wurde das Fusionsprotein Ox18sFvGFP synthetisiert. Dies wurde nach Reamplifikation mit den Primern A und L anstelle des p19-Proteins in den bereits vorhandenen Vektor pIE-p19 kloniert.

Oligonukleotide für pZeo-Ox18sFvGFP und pIE-Ox18sFv, Template: pCMV-Ox18Fab

| Primer | Sequenz | Restriktionsstellen | Richtung | Beschreibung |
|--------|--|----------------------|----------|--|
| A | TACTAGGCGCGCCATGGMTTGGGTGTGGAMC TTGCTATTCCTG | <i>Asc I</i> | for | V _H leader |
| F | AATTATGAGCTCAGATCCGCCGCCACCGCTC CCACCACCTCCGGAGCCACCGCCACCTGAGG AGACGGTGACCGAGGT | <i>BsP E1, Sac I</i> | rev | J _H + Linker, anneals Ox18-V _H |
| G | GGTGGCTCCGGAGGTGGTGGGAGCGGTGGCG GCGGATCTGAGCTCGTGCTGACCCAACTCC ACTC | <i>BsP E1, Sac I</i> | for | Linker, anneals Ox18-V _L |
| H | TCGACTTAATTAATTATTATACAGTTGGTGC AGCATC | <i>Pac I</i> | rev | Ox18-V _L |
| I | TTGACTTAATTAATTATTACAGCTCGTCCTT TTCGCTTACAGTTGGTGCAGCATC | <i>Pac I</i> | rev | Ox18-V _L -KDEL |
| J | TTCTGAGATGAGTTTTTGTTCATTATTAATT AAAGCGGCCGCTACAGTTGGTGCAGCATC | <i>Not I Pac I</i> | rev | Ox18sFv/8KsFv myc-KDEL #1 |
| K | TAGTAGAATTCTTATTACAGCTCGTCCTTTT CGCTATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGTTT TTGTTC | <i>Eco RI</i> | rev | Ox18sFv/8KsFv myc-KDEL #2 |
| L | TAGTAATCGATTACAGTTGGTGCAGCATC | <i>Cla I</i> | rev | Ox18sFv/8KsFv |

3.2.1.3 Adenovirus p19

Das adenovirale E3-Protein p19 wurde als GFP-Fusionsprotein kloniert. Hierzu wurde zunächst die EGFP-Sequenz aus dem Vektor pEGFP-N2 mit den Primern M und N amplifiziert und in den Vektor pcDNA3.1-Zeo(+) kloniert. Anschließend wurde aus der Adenovirus-Typ-2-DNA das p19-Protein amplifiziert und im Leseraster vor die GFP-Sequenz kloniert.

Für den bicistronischen Expressionsvektor wurde das 8KsFv-Konstrukt aus dem Vektor pIE-8KsFv (vgl. Abschnitt 3.2.1.4) herausgeschnitten und durch das mit dem Primern O und Q reamplifizierte p19-Protein ersetzt.

Oligonukleotide für pZeo-p19GFP und pIE-p19, Templates: Ad2 DNA, pEGFP-N2

| Primer | Sequenz | Restriktionsstellen | Richtung | Beschreibung |
|--------|--|-----------------------------|----------|---|
| M | TACTAATCGATGAATTCGCGGCCGCTATGGT GAGCAAGGGCGAG | <i>Cla I, Eco RI, Not I</i> | for | GFP |
| N | TAGTAGGGCCCTTAATTAATTATTACAGCTC GTCCTTTTCGCTCTTGTACAGCTCGTCCATG CCGAGAGTGAT | <i>Pac I, Apa I</i> | rev | EGFP-KDEL |
| O | TACTAGGTACCGGCGGCCATGAGGTACATG ATTTTAGGC | <i>Kpn I, Asc I</i> | for | p19 |
| P | TAGTAGAATTCTTATTAATTCAGATCCTCTT CTGAGATGAGTTTTTGTTCATCGATAGGCAT TTTCTTTTCATC | <i>Cla I, Eco RI</i> | rev | p19-myc (wird später abge- schnitten) |
| Q | TAGTAGCGGCCGCAGGCATTTTCTTTTCATC | <i>Not I</i> | rev | p19 |

3.2.1.4 8KsFv-Intrabodies

Der Intrabody wurde von Wayne Marasco, Boston in dem Vektor pRC/CMV (Invitrogen) zur Verfügung gestellt. Nach zweimaliger Reamplifikation mit den Primern R+J und R+K wurde er in den bicistronischen Vektor pIRES-EGFP (Clontech) kloniert.

Für das GFP-Fusionsprotein wurde die p19-Sequenz im Vektor pZeo-p19GFP durch den Intrabody (nach Reamplifikation mit Primern S und T) ersetzt.

Für das Adenovirus-Konstrukt wurde der Intrabody mit den Primern U und V reamplifiziert und in den Vektor PACCMV [164] kloniert. Anschließend wurden 293-Zellen, die Adenovirus-Verpackungsproteine zur vollständigen Synthese infektiöser Viruspartikel zur Verfügung stellen, mit dem Vektor PACCMV-8KsFv und dem adenoviralen Plasmid pJM17 [165] kotransfiziert. Durch die homologe Rekombination beider Plasmide entstehen replikationsdefekte adenovirale Genome. Nachdem die Zellen Konfluenz erreicht hatten, wurden sie mit 1,3 % Noble-Agar überschichtet und weiter bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

Nach 10 bis 14 Tagen bildeten sich Plaques, welche gepickt und weiter mit Hilfe von 293-Zellen vermehrt wurden. Hierzu wurden die Zellen nach Eintreten des zytopathischen Effekts geerntet und die Viruspartikel durch fünfmaliges Frieren-Tauen isoliert. Anschließend erfolgte die Aufreinigung über einen CsCl-Gradienten (zweimal) und die Entsalzung des rekombinanten Virus über Sephadex G25-Säulen. Um die Konzentration der Viruslösung zu bestimmen wurden 293-Zellen mit unterschiedlichen Verdünnungen an Virus infiziert und die durch die Viren gebildeten Plaques je Kulturschale gezählt. Die Viruslösung wurde bis zur Verwendung in Viruspuffer bei -70 °C gelagert. Bestimmung der Viruskonzentration:

$$c_{\text{Virus}} \text{ (pfu/ml)} = \frac{\text{Anzahl der Plaques}}{2} \times (\text{Verdünnung} \times 10)$$

Die Konzentration des aufgereinigten Ad-8KsFv betrug 1×10^{11} pfu/ml. Sämtliche Aufreinigungsschritte wurden von Heinz Tanzmann durchgeführt.

3.2.2 mRNA Isolierung

Alle Isolierungsschritte werden prinzipiell auf Eis durchgeführt. Um eine Kontamination mit den ubiquitär vorkommenden Ribonukleasen zu vermeiden, wurden alle Verbrauchsmaterialien autoklaviert und alle Lösungen mit DEPC-Wasser angesetzt und autoklaviert.

5×10^6 Zellen wurden nach dem Waschen in PBS abzentrifugiert ($250 \times g$, 5', RT) und sofort auf Eis mit eiskaltem Lysispuffer D versetzt.

Lysispuffer D

- 0,7 % Natriumcitrat-2-Hydrat
- 47,3 % Guanidiniumthiocyanat
- 0,5 % N-Lauroylsarcosin

Nachfolgend wurden

- 0,1× Volumen 2M Na-Acetat, pH 4,0
- 1× Volumen Phenol
- 0,2× Volumen Chloroform/Isoamylalkohol 24:1

zugegeben und durch kräftiges Schütteln auf dem Vortex-Schüttler aufgeschlossen. Nach 15' Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer bei 14.000 UpM 20' bei 4 °C abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde wieder mit

0,1× Volumen 2M Na-Acetat, pH 4,0

1× Volumen Phenol

0,2× Volumen Chloroform/Isoamylalkohol 24:1

versetzt, gemischt, 15' inkubiert und bei 14.000 UpM 20' bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde zur oberen wässrigen Phase 10 µl Glasmilch gegeben und die Probe 5' bei Raumtemperatur bei zeitweiligem Mischen inkubiert. Die an die Glasmilch gebundene Gesamt-RNA wurde dann durch einminütige Zentrifugation pelletiert und zweimal mit 1 ml 80 %igem Ethanol gewaschen. Nachfolgend wurde das Pellet in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und zweimal mit 15 µl DEPC-Wasser bei 55 °C für 5' eluiert. Zur Visualisierung von intakter RNA wurde ein Aliquot von 2 µl gelelektrophoretisch über ein 0,8 %iges Agarose-Gel (in TBE) aufgetrennt und die Konzentration photometrisch bestimmt.

3.2.3 Reverse Transkription von RNA

Es wurden 2 µg RNA in 20 µl H₂O vorgelegt. Dann wurde die Probe 5' auf 72 °C erhitzt, um eventuell vorhandene Tertiärstrukturen aufzuheben, auf Eis abgekühlt und 40 µl cDNA-Mix zugegeben. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch 10' bei Raumtemperatur inkubiert (Anlagerung der Primer), dann 75' bei 42 °C (Umschreibung in cDNA) und nachfolgend 10' bei 95 °C (Inaktivierung des Enzyms). Der Zyklus wurde mit 4 °C beendet.

40 µl cDNA-Mix

8 µl First strand buffer (5×)

4 µl dNTP (final = 250 µM je Nukleotid)

4 µl oligo-dT-Primer (= 10 pmol)

1 µl RNAsin

1 µl Reverse Transkriptase

4 µl DTT (final = 3 mM)

ad 40 µl DEPC-Wasser

3.2.4 PCR-Reaktion

25 µl oder 50 µl Reaktionsmix wurde entsprechend den Angaben des Herstellers pipettiert. Es wurde grundsätzlich mit der Polymerase Vent™ (New England Biolabs) gearbeitet, da diese eine Proof-Reading-Eigenschaft besitzt. Primerpaare zur Amplifikation können Abschnitt 3.2.1 entnommen werden. Reverse Primer für den c-Terminus des Proteins enthalten wahlweise die KDEL-Retentionssequenz, die Proteine im ER zurückhält.

PCR-Ansatz

10 pmol 3'-Primer

10 pmol 5'-Primer

16 U/ml Vent™ Polymerase

je 0,1 µM dNTP

in 1× ThermoPol Buffer (enthält MgCl₂)

Die angegebenen Bedingungen konnten für alle PCR-Reaktionen mit einer Variation von 30 - 35 Zyklen angewendet werden.

Reaktionsbedingungen (A):

| | | | |
|--------------------|-----|-------|---|
| Denaturierung | 5' | 94 °C | |
| 30 Zyklen à | | | |
| (Denaturierung) | 30" | 94 °C | |
| (Primeranlagerung) | 30" | 55 °C | (oder höher, entsprechend des eingesetzten Primers) |
| (Polymerisation) | 30" | 72 °C | |
| End-Polymerisation | 7' | 72 °C | |

Reaktionsbedingungen für die Assemblierungs-PCR (overlap-extension; B):

Ansatz : Templates Ox18-VH, -VL, Primer F+G (vgl. Abschnitt 3.2.1.2), dNTP, Vent, ThermoPol Buffer

| | | |
|--------------------|-----|-------|
| Denaturierung | 5' | 94 °C |
| 7 Zyklen à | | |
| (Denaturierung) | 2' | 94 °C |
| (Primeranlagerung) | 30" | 72 °C |
| End-Polymerisation | 7' | 72 °C |

Anschließend wurden Primer A und H bzw. I zugegeben und das PCR-Programm unter normalen Reaktionsbedingungen (A) durchlaufen.

Beim Einsatz degenerierter Primer, wie für die Amplifikation der polymorphen Leadersequenzen von Immunglobulinen benötigt, wurde zwischen Denaturierung und Anlagerung der Primer eine 60-sekündige Rampe geschaltet, d.h. die Anlagerung erfolgte langsamer, bei allmählich sinkender Temperatur.

3.2.5 Klonierung der Konstrukte in Expressionsvektoren

Der Restriktionsverdau der PCR-Fragmente und der Plasmide erfolgte nach Angaben des Herstellers. Alle Restriktionsendonukleasen wurden von dem Hersteller New England Biolabs (NEB) bezogen.

Die Aufreinigung der Fragmente aus Agarose-Gelen wurde mit Hilfe des Gel-Extraktionskits Jetquick von Genomed über sogenannte spin columns durchgeführt. Es wurde nach Angaben des Herstellers verfahren.

3.2.5.1 Auftrennung der DNA-Fragmente durch horizontale Agarosegelelektrophorese

Da die Auftrennung der PCR-Amplifikate sowohl von deren Länge, als auch von der Polymerisationsdichte der Agarose abhängig ist, wurden je nach der Länge der erwarteten Fragmente Gele mit einem Agarosegehalt zwischen 0,8 % und 1,2 % hergestellt. Die Agarose wurde in einem entsprechenden Volumen 1× TAE-Puffer durch 2-3 minütiges Kochen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 50-60 °C wurde die Lösung mit Ethidiumbromid (ca. 20 µg EB/100 ml) versetzt und in ein gekühltes Gelbett mit Kamm

für die Auftragstaschen gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel so in die Elektrophoresekammer überführt, dass das Gel vollständig mit TAE-Puffer bedeckt war. Die aufzutragenden Proben (ca. 15-20 µl) sowie ein DNA-Molekulargewichtsmarker (1 kb-Leiter) wurden mit 1/10 Volumen des bromphenolblauhaltigen Probenpuffers versetzt und quantitativ in die Taschen überführt. Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die DNA-Fragmente mit UV-Licht anhand des fluoreszierenden, interkalierten Ethidiumbromids detektiert. Zur Dokumentation wurde bei Anregung der Fluoreszenz auf einem Transilluminator (λ = 254 nm) mit einer Videokamera über das E.A.S.Y.-System (HeroLab) ein digitalisiertes Bild erzeugt und ausgedruckt.

3.2.5.2 Herstellung kompetenter Zellen

Zunächst wurde eine Vorkultur von Bakterien über Nacht angelegt. Diese Vorkultur wurde 100-fach in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer Zelldichte entsprechend einer Absorption von O.D.600 nm = 0,5 bei 220 nm geschüttelt. Die Zellen wurden nach Erreichen dieser Zelldichte für 5' auf Eis inkubiert, anschließend durch Zentrifugation (2500 × g, 5', 4 °C) geerntet, und das Zellsediment mit 40 ml eiskaltem Ca/Glycerol-Puffer gewaschen und anschließend wieder in 40 ml eiskaltem Ca/Glycerol-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation auf Eis für 30' wurden die Zellen erneut zentrifugiert, anschließend erneut in 12 ml eiskaltem Ca/Glycerol-Puffer resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Ca/Glycerol-Puffer

| | |
|--------|-------------------------|
| 100 ml | 0,6 M CaCl ₂ |
| 20 ml | 0,5 M PIPES pH 7,0 |
| 730 ml | H ₂ O |

3.2.5.3 Transformation von Bakterien

Nach Auftauen der kompetenten Zellen (100 µl) auf Eis wurden 1 bis 100 ng DNA zu der Zellsuspension gegeben und für 15' auf Eis inkubiert. Danach erfolgte für 2' ein Hitzeschock bei 42 °C und eine erneute Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden

die Bakterien für 1h bei 37 °C inkubiert, 50 - 100 µl der Suspension direkt auf LB-Ampicillin-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.5.4 Präparation von Plasmid-DNA: "Maxiprep"-Methode

Größere Mengen an DNA ("Maxiprep") wurden mit Hilfe des JetStar Extraktionskit (Genomed) aufgereinigt. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die optische Dichte (O.D.) bei einer Wellenlänge von 260 nm im Pharmacia GeneQuant RNA/DNA-Calculator mittels einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von $d = 1$ cm bestimmt. Die Konzentration der DNA [161, 162] berechnete sich aus der Formel

$$[\mu\text{g/ml}] \text{ dsDNA} = \frac{50 \times \text{Verdünnung} \times \text{O.D.}_{260 \text{ nm}}}{1000}$$

3.2.5.5 Präparation von Plasmid-DNA: "Miniprep"-Methode

Zur Präparation geringer Mengen an DNA wurde in Anlehnung an die Methode von J.D. Brown [166] verfahren.

Hierfür werden zunächst 2 ml einer Übernacht-Bakterienkultur bei 14.000 UpM für 1' in einer Mikrozentrifuge pelletiert und der Überstand dekantiert. Anschließend werden die Zellen in 200 µl Resuspensionslösung P1 resuspendiert und weitere 200 µl Lyse-Lösung P2 zugegeben. Die Probe wird durch mehrmaliges Invertieren vorsichtig gemischt und bei Raumtemperatur 5' inkubiert. Danach werden 200 µl Neutralisierungslösung P3 zugegeben, die Probe durch kräftiges Schütteln gemischt und 5' abzentrifugiert. Im Anschluß an die Zentrifugation wird der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit 200 µl Silica-Suspension versetzt und vermischt. Die an die Glasmilch gebundene DNA wird im folgenden Schritt für 1' abzentrifugiert und einmal mit 500 µl Waschlösung gewaschen. Die Waschlösung wird nach Zentrifugation mittels Vakuumpumpe abgesaugt und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge für 5' getrocknet. Zur Elution der DNA werden 42 µl H₂O zugegeben, bei 55 °C für 2' inkubiert und nach einminütiger Zentrifugation 38 µl davon in ein neues Gefäß mit 10 µl 500 µg/ml Ribonuklease A transferiert.

Puffer P1

50 mM Tris-Base, pH 8,0
10 mM EDTA

Puffer P2

200 mM NaOH
1 % SDS

Puffer P3

3 M Kaliumazetat
auf pH 5,5 mit Essigsäure
einstellen

Silica-Suspension

5 g Silica (Silikon Dioxid)
in 25 ml H₂O resuspendieren.

45' absetzen lassen und milchigen Überstand
abpipettieren.

Waschvorgang 2× wiederholen. Sehr feine
Silica-Partikel werden ausgewaschen.

Rest-Suspension in 50 ml H₂O resuspendieren.

3.3 Immunochemische Methoden

3.3.1 *in vitro*-Translation im TNT™ Retikulozytenlysat

Ox18Fab (schwere und leichte Kette) in pCMV wurde im TNT™ Retikulozytenlysat nach dem Protokoll von Promega transkribiert und translatiert. Die Transkription erfolgte mit der T7-Polymerase unter Zugabe von ³⁵S-Methionin (10 mCi/ml) in einem 10 µl Reaktionsansatz bei 30 °C für 90'. Für die post-translationale Analyse wurden die translatierten Proteine über ein 12,5 %iges Polyacrylamidgel (Acrylamid-Bisacrylamid) in der SDS PAGE Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert.

3.3.2 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation radioaktiv-markierter Proteine wurde für die Detektion der schweren und leichten Kette des Ox18Fab-Fragments am Dana-Farber Cancer Institute in Boston durchgeführt. Zur Expression der Proteine wurden COS-1 Zellen mit der DEAE-Dextran Transfektionsmethode (vgl. Abschnitt 3.5.4.4) transfiziert.

Sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindende COS-1 Zellen wurden 48-60h nach Transfektion dreimal mit PBS gewaschen und für 3h mit 5 ml Cystein-freiem (antibiotikahaltigem, serumfreien) RPMI bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 100 µCi ³⁵S -Cystein zugegeben und die Zellen weitere 3h inkubiert.

Es wurden zwei Proben anti-Maus-IgG-Sepharose vorbereitet: eine zur Präzipitation des Zelllysats und eine zur Präzipitation des Überstands. 1h vor Ablauf der Inkubationszeit wurden bei der anti-Maus-IgG-Sepharose unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Hierfür wurde die anti-Maus-IgG-Sepharose zweimal mit je 750 µl PBS und einmal mit 4 % BSA (in PBS) gewaschen. Die gewaschene Sepharose wurde darauf wieder mit 700 µl 4 % BSA für 30' bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde, nach Zentrifugation und Abnahme des Überstands, das Lysat bzw. der Überstand nicht-radioaktiver, untransfizierter COS-1 Zellen zugegeben und der Ansatz 30' bei 4 °C inkubiert.

Für die Lyse wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, 1 ml eiskalter RIPA-Puffer mit Protease-Inhibitor zugegeben und 10' bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit einem Zellschaber abgelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und 10" bei höchster Stufe auf dem Vortex-Schüttler aufgeschlossen. Abschließend wurden die Zelltrümmer für 3' bei maximaler Geschwindigkeit in einer Mikrozentrifuge abzentrifugiert und das Lysat überführt.

Im folgenden Schritt wurden die radiokativ-markierten, Ox18Fab-transfizierten COS-1 Zellen nach obiger Beschreibung lysiert. Das Lysat wurde mit 60 µl, der Überstand (5 ml) mit 75 µl der vorbehandelten anti-Maus-IgG-Sepharose versetzt und bei 4 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Sepharose fünfmal mit RIPA-Puffer gewaschen, wobei sie nach dem ersten Waschschrift in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Danach wurde sie zweimal mit H₂O gewaschen. Der Überstand wurde bis auf ca. 50 µl verworfen. Abschließend wurde 50 µl SDS-Probenpuffer (vgl. Abschnitt 3.3.3) zugegeben, die Probe 5' bei 100 °C gekocht und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Nach Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel wurde das Gel für die Autoradiographie vorbereitet. Hierzu wurde es 30' in 50 % Ethanol, 10 % Eisessig fixiert, 20' mit EN³HANCE-Lösung inkubiert, dreimal mit H₂O gewaschen und 30' in 2 % Glycerol inkubiert. Abschließend wurde es im Geltrockner unter Vakuum für 1h bei langsam ansteigender Temperatur bis zu 72 °C auf einen Filter getrocknet. Der Filter mit dem aufgetrockneten Gel wurde dann auf einen Röntgenfilm gelegt, über Nacht bei -70 °C gelagert und entwickelt.

Reagenzien für die Immunopräzipitation:

Protein-A Sepharose-Suspension

- 1 g Protein-A Sepharose in 20 ml 50 mM Tris-HCL pH 7,4 aufquellen lassen
- 1h bei 4 °C aufquellen lassen, danach abzentrifugieren für 10' bei 2500 × g abzentrifugieren
- zweimal mit 50 mM Tris-HCL pH 7,4 waschen
- resuspendieren in 15 ml
 - 0,5 % Nonidet-P40
 - 1 mg/ml BSA
 - 1 mM Natriumazid

anti-Maus-IgG-Sepharose

- 1 ml Protein-A Sepharose-Suspension mit 20 µl Kaninchen-anti-Maus IgG (Sigma) über Nacht bei 4 °C schütteln

RIPA-Puffer

| | |
|--------|--------------------|
| 150 mM | NaCl |
| 50 mM | Tris-HCL pH 7,4 |
| 0,5 % | Natriumdeoxycholat |
| 0,5 % | Nonidet-P40 |
| 0,1 % | SDS |
| 1 mM | EDTA |

Protease-Inhibitor

| | |
|------|------|
| 2 mM | PMSF |
|------|------|

3.3.3 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde entsprechend der Vorschrift nach Laemmli [167] durchgeführt. Die Proteinproben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und nach 5' Kochen in die Probentasche aufgetragen.

Die Proteinproben wurden zunächst im Sammelgel bei 10 mA für 10', danach im Trenngel bei einer konstanter Stromstärke von 25 mA für ca 90' aufgetrennt.

Reagenzien für die Mini-Gel-Apparatur (Biometra):

SDS-Probenpuffer

| | |
|--------|------------------------------------|
| 2 ml | 0,625 M Tris/HCL pH 6,8 |
| 2 ml | 10 % SDS |
| 5 ml | Glycerol |
| 0,5 ml | -Mercaptoethanol |
| 0,1 ml | Bromphenolblau (1 % in Ethanol) |
| 0,4 ml | H ₂ O |

Tenngel 12,5 % (6 ml pro Gel)

| | |
|--------|---|
| 2,5 ml | 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid Stocklösung |
| 1,2 ml | 1,88 M Tris/HCL pH 8,8 |
| 1,2 ml | 0,5 % SDS |
| 1,1 ml | H ₂ O |
| 5 µl | TEMED |
| 30 µl | 10 % Ammoniumpersulfat |

Sammelgel (2 ml pro Gel)

| | |
|---------|---|
| 0,33 ml | 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid Stocklösung |
| 0,4 ml | 0,625 M Tris/HCL pH 6,8 |
| 0,4 ml | 0,5 % SDS |
| 0,87 ml | H ₂ O |
| 2 µl | TEMED |
| 10 µl | 10 % Ammoniumpersulfat |

Tenngel 7,5 % (6 ml pro Gel)

| | |
|--------|---|
| 1,5 ml | 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid Stocklösung |
| 1,2 ml | 1,88 M Tris/HCL pH 8,8 |
| 1,2 ml | 0,5 % SDS |
| 2,1 ml | H ₂ O |
| 5 µl | TEMED |
| 30 µl | 10 % Ammoniumpersulfat |

Laufpuffer

| | |
|--------|-----------|
| 15,1 g | Tris-Base |
| 72 g | Glycin |
| 5 g | SDS |

3.4 Methoden der Durchflusszytometrie

3.4.1 Oberflächenmarkierung mit Antikörpern für die Durchflusszytometrie

Die benötigte Antikörper-Menge zur Oberflächenmarkierung der Zellen wurde für jeden Antikörper zuvor austitriert. Im Durchschnitt wurden ca. 5×10^5 /50 µl Zellen mit 0,5 µg /20 µl Antikörper-Lösung für 20' bei 4 °C inkubiert. Die Zellen befanden sich entweder in Wachstumsmedium (z.B. DMEM) mit 2 % FKS oder in FACS-Puffer. Anschließend wurde mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt und bei $200 \times g$ bei 4 °C für 4' zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ca. 50 µl abgenommen und die Zellen durch Zugabe von 150 µl

Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die fixierten Zellen können bis zur FACS-Analytik (vgl. Abschnitt 3.4.3) maximal Tage bei 4 °C gelagert werden.

Beim Einsatz eines unmarkierten Antikörpers wurde nach der Zentrifugation ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper (0,5 µg /50 µl) zugegeben und obige Inkubations- und Waschprozedur wiederholt. Die Zellen wurden wie bei der primären Färbung fixiert.

Alle Zentrifugationsschritte für die extra- und intrazelluläre FACS-Färbung wurden bei 200 × g bei 4 °C für 4' durchgeführt.

Reagenzien für die FACS-Färbung

FACS-Puffer

| | |
|-------|-----------------------|
| 2 % | FKS |
| 0,1 % | Natriumazid in PBS |

Paraformaldehyd-Lösung (1 %)

- 0,1 g Paraformaldehyd werden in 500 µl H₂O und 25 µl 1 N NaOH einige Minuten bei 80 °C im Heizblock unter Schütteln gelöst.
- Die Lösung wird zu 9,5 ml PBS gegeben und vermischt.
- Die fertige Lösung kann bis zu einer Woche bei 4 °C gelagert werden.

3.4.2 Intrazelluläre Färbung mit Antikörpern für die Durchflusszytometrie

Zur Färbung von intrazellulär lokalisierten MHC I-Molekülen wurde der Cytofix/Cytoperm-Kit von PharMingen eingesetzt. Um eine Anfärbung der Oberflächen-MHC-Moleküle zu vermeiden, wurden diese entweder zuvor durch Papainverdau abgespalten oder durch FITC-markierte anti-MHC-I-Antikörper vollständig besetzt (siehe Oberflächenmarkierung Abschnitt 3.4.1). Die Färbung der intrazellulären MHC I-Moleküle erfolgte dann mit dem gleichen, in einer geringeren Konzentration eingesetzten, PE-markierten Antikörper, so dass eine Verdrängung des FITC-markierten Antikörpers gewährleistet war.

Zur Färbung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 200 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung resuspendiert und für 20' bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden sie mit 1 ml Perm-Wash-Lösung gewaschen und mit 0,5 µg /50 µl (bei Papainverdau) bzw. 0,2 µg /50 µl anti-MHC I (in Perm-Wash-Lösung) für 30' bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Perm-Wash-Lösung gewaschen und in 150-200 µl PBS resuspendiert und analysiert.

Die Zellen können bis zur FACS-Analytik ca. fünf Tage bei 4 °C gelagert werden.

3.4.2.1 *Papainverdau von Oberflächenmolekülen*

Um die MHC-I-Moleküle von der Zelloberfläche zu entfernen und so nur noch die intrazellulär exprimierten Moleküle markierbar zu machen, wurden die Zellen mit Papain behandelt. Hierzu wurden die Zellen für 30' mit Papainlösung bei 37 °C inkubiert, zweimal mit serumhaltigem Medium gewaschen und für die intrazelluläre Färbung eingesetzt.

3.4.3 FACS-Analytik

Die Messung der Zellen erfolgte an einem FACSort Durchflusszytometer (Becton Dickinson). Für die in dieser Arbeit enthaltenen Grafiken wurden die Messdaten mit der Software FlowJo (Tree Star) ausgewertet, generell jedoch mit Hilfe der Cellquest-Software (Becton Dickinson).

3.5 Methoden der Zellkultur

3.5.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle Zelllinien wurden nach Standardprotokollen [168] kultiviert. Die Kultur von primären Keratinozyten ist in Abschnitt 3.5.2 aufgeführt. Die Zusammensetzung der Medien für die einzelnen Zelllinien oder Primärzellen ist dem Abschnitt 2.15 zu entnehmen.

3.5.2 Etablierung einer primären Keratinozytenkultur

Die Isolierung und Anzucht der Rattenkeratinozyten wurde von Elke Effenberger durchgeführt. Als Ausgangsmaterial für die Isolierung wurden die Ohren von DA-Ratten verwendet. Das Ohr wurde mit Pinzetten gespalten, in kleinere Stücke zerschnitten und dann in einer Glas-Petrischale über Nacht in 0,25 % Trypsin, 0,1 % EDTA bei 4 °C trypsinisiert. Am nächsten Tag wurde die Dermis von der Epidermis mit einer Pinzette abgezogen und verworfen. Das verbleibende Epidermisgewebe wurde in Trypsin/EDTA-Lösung für ca. 5' vorsichtig pipettiert und anschließend durch sterile Nylon-Zellsiebe (100 µm Porendurchmesser) in ein steriles 15-ml-Röhrchen überführt. Der Trypsinverdau wurde mit einem äquivalenten Volumen an FKS abgestoppt und die Zellen bei $250 \times g$ für 5' abzentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen in Keratinozytenmedium (vergl. Abschnitt 2.15) aufgenommen und in Kulturflaschen in einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen /cm² zusammen mit NIH3T3-Fibroblasten als Feederzellen ausgesät. Nach 48h waren bereits adhärenente Zellen mit typischer polygonaler Form ("Pflastersteine") als kleine Zellnester zu erkennen. Der Nachweis, dass es sich tatsächlich um Keratinozyten handelte wurde durch Anfärbung mit anti-Keratin-Antikörpern erbracht.

Das Passagieren der stark adhärenenten Zellen erfolgte alle 3 - 4 Tage mit einer relativ hohen Trypsin/EDTA-Konzentration von 0,25 % Trypsin und 0,1 % EDTA, was der fünffachen Menge der normal eingesetzten Konzentration zum Ablösen von Zellen entspricht. Der Verdau erfolgte für 15' bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen im Verhältnis von 1:3 umgesetzt. Ein Waschschrift war dabei nicht notwendig. Die Anzahl der möglichen Passagen war bei den ca. 50 durchgeführten Präparationen sehr unterschiedlich. Einige Kulturen konnten nur bis zu wenigen Passagen kultiviert werden, andere bis zu über 100 Passagen - bei gleichbleibender Morphologie und unverändertem Wachstumsverhalten.

3.5.3 Kryokonservierung und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zur Langzeitlagerung müssen Zellen mit einem Gefrierschutzmittel eingefroren werden, das die Kristallisation von intrazellulärem Wasser verhindert und so die Zellmembranen vor der Zerstörung durch die wasserbedingte Volumenzunahme schützt. Dimethylsulfoxyd (DMSO) kann zwar die Wasserkristallisation verhindern, ist für die Zellen bei RT allerdings toxisch, weshalb der Einfriervorgang bei 4°C durchgeführt wurde. 1 - 20 × 10⁶ Zellen pro Ampulle wurden in 1,8 ml-Aliquots zunächst bei -80°C eingefroren, bevor die Ampullen zu ihrer Langzeitlagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff bei -196°C aufbewahrt wurden.

Zum Auftauen wurden die Ampullen zügig im 37°C-Wasserbad aufgetaut und tropfenweise in Kulturmedium transferiert und abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in entsprechendem Medium resuspendiert und in geeigneter Zelldichte in Kulturgefäße ausgesät.

Einfriermedium
40 % FKS
10 % DMSO
in Kulturmedium

3.5.4 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Je nach Zelltyp wurde eine der nachfolgenden Transfektionsmethoden eingesetzt. 293-Zellen, NRK-52E- und NBT-II-Zellen ließen sich am Besten mit der Calcium-Phosphat-Methode transfizieren, Rattenkeratinozyten mit dem Transfektionsagens *DMRIE-CTM* und für COS-1 Zellen stellte sich die Transfektion mit DEAE-Dextran als beste Methode heraus. Für alle Methoden sollten sich die Zellen am Tag der Transfektion in der logarithmischen Wachstumsphase befinden, bei ca. 50 % Konfluenz.

Für die transiente Expression wurden die Zellen 48h nach Transfektion analysiert. Zur Etablierung stabil exprimierender Klone wurden die Zellen 48h nach Transfektion entsprechendem Selektionsmedium ausgesetzt (vgl. Abschnitt 3.5.5).

3.5.4.1 Transfektion mit Calciumphosphat

Nachfolgende Methode ist für 10-cm-Petrischalen beschrieben. Vor der Transfektion wurde das Kulturmedium durch 10 ml frisches Medium ersetzt. Danach wurde das Präzipitat hergestellt: zu 204 µl H₂O in einem 15-ml-Röhrchen wurden 15 µl [1µg/ml]] DNA und 31 µl 2M CaCl₂ gegeben und gemischt. Anschließend wurden 250 µl 2× HBSP-Puffer zugegeben und vorsichtig vermischt. Dazu wurde eine 1 ml Pipette bis auf den Röhrchenboden geführt

und der Puffer langsam herauspipettiert; am Ende wurden noch vorsichtig ca. 15 Luftblasen zur Vermischung durch die Pipette gedrückt. Zur Präzipitat-Formierung wurde der Ansatz 15' bei Raumtemperatur inkubiert, danach durch einmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Platte wurde dann einige Male geschwenkt und je nach Zelltyp 4 - 24h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. 293-Zellen wurden 12h, die Ratten-Zelllinien NRK-52E und NBT-II ca. 20h inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Kulturmedium weiterkultiviert.

2× HBSP-Puffer

| | |
|--------|----------------------------------|
| 1,5 mM | Na ₂ HPO ₄ |
| 10 mM | KCl |
| 280 mM | NaCl |
| 12 mM | Glukose |
| 50 mM | HEPES, pH 7,0 |

3.5.4.2 Transfektion mit DMRIE-CTM

Nachfolgende Methode ist für 6-Well-Multischalen beschrieben. Zunächst wurde 2 µg DNA in 500 µl OPTI-MEM gelöst. Die zweite Lösung wurde durch kräftiges Mischen von 5 µl DMRIE-CTM Reagenz in 500 µl OPTI-MEM hergestellt. Anschließend wurden beide Lösungen zusammengegeben, durch einmaliges Pipettieren vermischt und 30' bei Raumtemperatur zur Bildung der Komplexe inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit dem 1-ml-Transfektionsansatz für 5h inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit abgezogen und durch normales serumhaltiges Medium ersetzt.

3.5.4.3 Transfektion mit SuperfectTM

Bei dieser Transfektionsmethode wurde ohne Modifikationen nach den Angaben des Herstellers verfahren.

3.5.4.4 Transfektion mit DEAE-Dextran

Zu einmal mit PBS gewaschenen Zellen wurde eine Lösung aus 2 ml PBS, 15 µg DNA und 100 µl 50 mg/ml DEAE-Dextran (in PBS) gegeben und die Zellen für 30' bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden 5 ml serumfreies DMEM mit 100 µM Chloroquine zugegeben und die Zellen für weitere 2,5h inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, 5 ml serumfreies DMEM, 10 % DMSO zugegeben und die Zellen 3' bei

Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen und in serumhaltigem Kulturmedium weiterkultiviert.

3.5.5 Etablierung stabil exprimierender Zellklone

Um Zellklone, bei denen das Zielgen stabil in die genomische DNA integriert ist, zu isolieren und separieren, wurden die Zellen zunächst 48h nach Transfektion mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Dazu wurden die (adhärenten) Zellen unter Zumischen von untransfizierten Zellen in verschiedenen Ratios in 14-cm-Petrischalen umgesetzt. Bei Transfer des Neo- (Neomycin-phosphotransferase) Gens wurden die Zellen mit G418 (Neomycin) kultiviert, bei Transfer von ZeocinTM-Resistenz wurde mit Zusatz von ZeocinTM kultiviert. Nach etwa 10 Tagen Kultur in Selektionsmedium waren einzelne Zellklone deutlich als kleine Zellnester makroskopisch zu erkennen. Bei zusätzlichem Transfer des GFP-Gens wurden diese unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und nur grün-fluoreszierende Zellklone isoliert. Zur Isolierung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und darauf geachtet, dass keine Flüssigkeit mehr zurückblieb. Anschließend wurden auf eine Größe von etwa 4 cm² ausgeschnittene Filterpapiere in Trypsinlösung angefeuchtet und auf die Zellklone gelegt. Nach ca. 15-minütiger Inkubation bei 37 °C konnten diese mit den anhaftenden Zellen mittels einer Pinzette in vorbereitete 24-Well Multischalen mit Medium transferiert werden. Die so isolierten Zellen setzten sich im Laufe der Kultur auf dem Boden der Wells ab und expandierten. Bei Konfluenz wurden sie in größere Kulturgefäße passagiert.

3.5.6 Infektion von eukaryotischen Zellen mit Adenovirus

Für die Adenovirus-Infektion wurden die humanen Keratinozyten bei ca. 90 % Konfluenz mit Infektionslösung für 30' bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde Kulturmedium zugegeben und die Zellen bis zur Analytik für 48h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Infektionen wurden von Cornelia Doebis durchgeführt.

Infektionslösung

100 MOI Virus

4 µg/ml Polybren
in PBS

(MOI: multiplicity of infection,
Viruspartikel / Zelle)

3.5.7 Separation von Zellen mittels Magnetpartikel

Um kontaminierende (MHC-I-positive) Zellen von den übrigen Zellen zu trennen wurden diese zunächst mit dem entsprechenden Antikörper markiert und dann mit an Sekundärantikörper gekoppelten Magnetpartikeln (Dynal) besetzt. Die so markierten Zellen konnten dann über einen Magneten entfernt werden.

Hierzu wurden zunächst die Zellen mit dem entsprechenden Antikörper wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben markiert, wobei grundsätzlich 1 µg Antikörper pro 1×10^6 Zellen eingesetzt wurde. Nach Auswaschen der Antikörper wurden die Zellen in ein 10-ml-Röhrchen mit zuvor mit Medium gewaschenen Magnetpartikeln in möglichst kleinem Volumen (ca. 1 ml) gegeben. Zum Waschen der Magnetpartikel wurde das Röhrchen an einen Magneten gehalten, wobei dann das zugegebene Medium durch Abpipettieren von den an der Röhrchenwand haftenden Partikeln getrennt werden konnte. Eingesetzt wurde, in Bezug auf die abzutrennende Zellzahl, die zehnfache Menge an Magnetpartikeln. Es folgte eine 30-minütige Inkubation bei leichtem Schütteln bei 4 °C. Im Anschluss wurden die markierten Zellen durch magnetische Separation abgetrennt und die verbleibenden Zellen in entsprechende Kulturgefäße transferiert.

3.5.8 Die Gemischte Lymphozytenkultur

Zur Vorstimulation der im Zytotoxizitäts-Test eingesetzten Lymphozyten wurden diese für vier bis fünf Tage mit allophen Leukozyten kokultiviert. Als Responderzellen wurden Lewis-, als Stimulatorzellen DA-Milzzellen eingesetzt. Das verwendete Medium ist dem Abschnitt 2.15 zu entnehmen.

Nach Entnahme der Ratten-Milzen wurden diese mit einem Potter in 30 ml PBS homogenisiert, durch 40-µm-Nylon-Zellsiebe gegeben und auf 15 ml Ficoll (PAN Biotech, Dichte = 1,091 g/ml) überschichtet. Anschließend erfolgte die Ausbildung des Gradienten bei $370 \times g$ für 40' bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation konnte der die Lymphozyten enthaltende weißliche Ring in der Mitte des Röhrchens abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt werden. Nach zwei Waschschritten (einmal mit PBS, einmal mit Medium) wurden die Stimulator-Zellen mit 30 Gray bestrahlt und im Verhältnis von 1:5 mit

den Responderzellen kultiviert. Es wurden 1×10^8 Stimulatorzellen mit 2×10^7 Responderzellen in senkrecht-stehenden 75- cm²-Kulturflaschen in 40 ml Medium kultiviert.

3.5.9 Zytotoxizitäts-Test

Der Zytotoxizitäts-Test basiert auf der Lyse zuvor markierter Targetzellen durch Effektorzellen. In diesem Fall handelt es sich bei den Targetzellen um Rattenkeratinozyten und bei den Effektorzellen um in der Gemischten Lymphozytenkultur (vgl. Abschnitt 3.5.8) allogen vorstimulierte zytotoxische T-Zellen aus Ratten-Milzen.

3.5.9.1 Markierung der Targetzellen mit Europium

Zytotoxizitäts-Assays, die auf der Fluoreszenz von Lanthaniden basieren, stellen eine hervorragende Alternativmethode zur gängigen Markierung von Zellen mit radioaktivem Chrom dar. Das am häufigsten beschriebene Lanthanid für den Nachweis von zellvermittelter Zytotoxizität ist Europium [169-177]. Der Test wurde 1986 von Blomerg et al. entwickelt [178, 179] und stellt bisher die einzige nicht-radioaktive Methode dar, deren Sensitivität vergleichbar mit der des konventionellen ⁵¹Chrom-Assays ist. Das Prinzip beruht auf der zeitauflösenden Fluoreszenzmessung (time-resolved fluorometry), bei der die einzigartigen Eigenschaften von Lanthanid-Chelaten ausgenutzt werden. Da ihre Fluoreszenz 20-35 mal länger als die herkömmlicher Fluorophore ist [180-182], wird die Messung erst gestartet, nachdem die unspezifische Hintergrund-Fluoreszenz abgeklungen ist (vgl. Abb. 9).

Für eine quantitative Inkorporation von Europium sollten sich die Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Pro Färbung wurden ca. 1×10^7 Zellen einmal mit Puffer I gewaschen, mit kaltem Markierungspuffer in 1,5 ml resuspendiert und 15' bei 4 °C inkubiert. Dabei wurden die Zellen alle 5' gemischt. Anschließend wurden 63 µl 100 mM CaCl₂ zugegeben (finale Konzentration = 4 mM) und die Zellen weiter 5' bei 4 °C inkubiert. Kalzium bewirkt eine Schließung der (zuvor durch den dextransulfathaltigen Markierungspuffer entstandenen) Poren. Nach dieser Markierungsprozedur wurden die Zellen einmal mit kaltem Puffer II und dreimal mit Medium gewaschen, wobei die Temperatur graduell auf Raumtemperatur erhöht wurde. Die so markierten Targetzellen wurden dann sofort zu den bereits vorgelegten Effektorzellen in 96-Rundboden-Wells gegeben.

Puffer I

| | |
|-----------------------|-------------------|
| 50 mM | HEPES |
| 93 mM | NaCl ₂ |
| 5 mM | KCl |
| 2 mM | MgCl ₂ |
| auf pH 7,4 einstellen | |

Puffer II

| | |
|-------------|-------------------|
| 2 mM | CaCl ₂ |
| 10 mM | Glukose |
| in Puffer I | |

Markierungspuffer für Rattenkeratinozyten

| | |
|-------------|----------------------------|
| 800 µM | EuCL ₃ |
| 4 mM | DTPA |
| 500 µg/ml | Dextransulfat (MW 500.000) |
| in Puffer I | |

Markierungspuffer für NRK-52E

| | |
|-------------|----------------------------|
| 600 µM | EuCL ₃ |
| 3 mM | DTPA |
| 500 µg/ml | Dextransulfat (MW 500.000) |
| in Puffer I | |

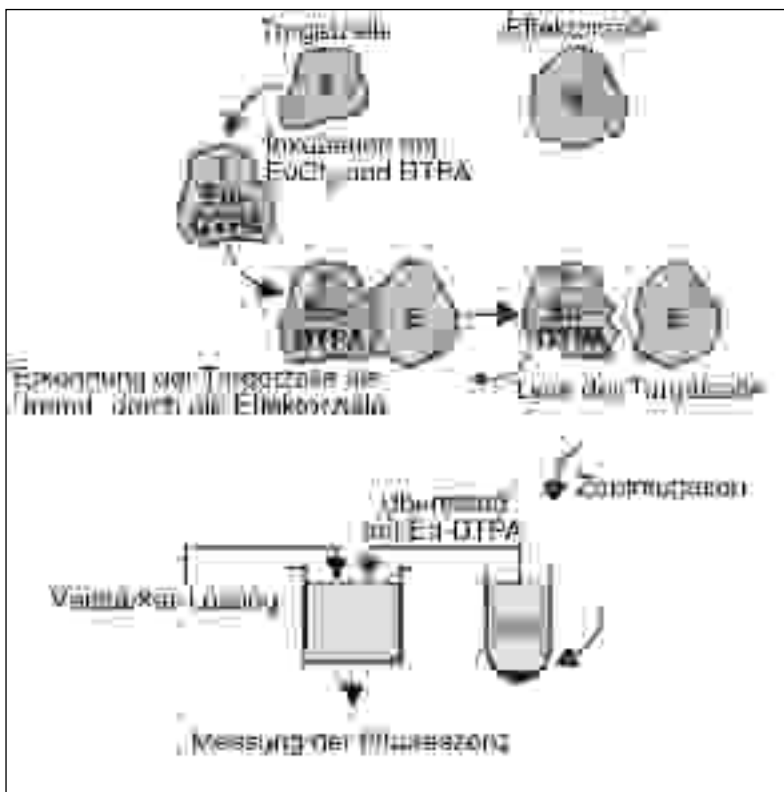


Abb. 7: Prinzip des Zytotoxizitäts-Tests mit Europium [modifiziert nach [183].

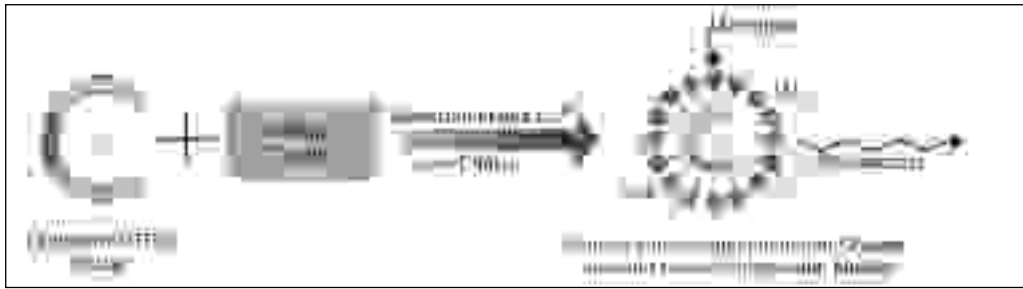


Abb. 8: Messung von Eu-DTPA mit Zusatz von Verstärker-Lösung (modifiziert nach [183]).

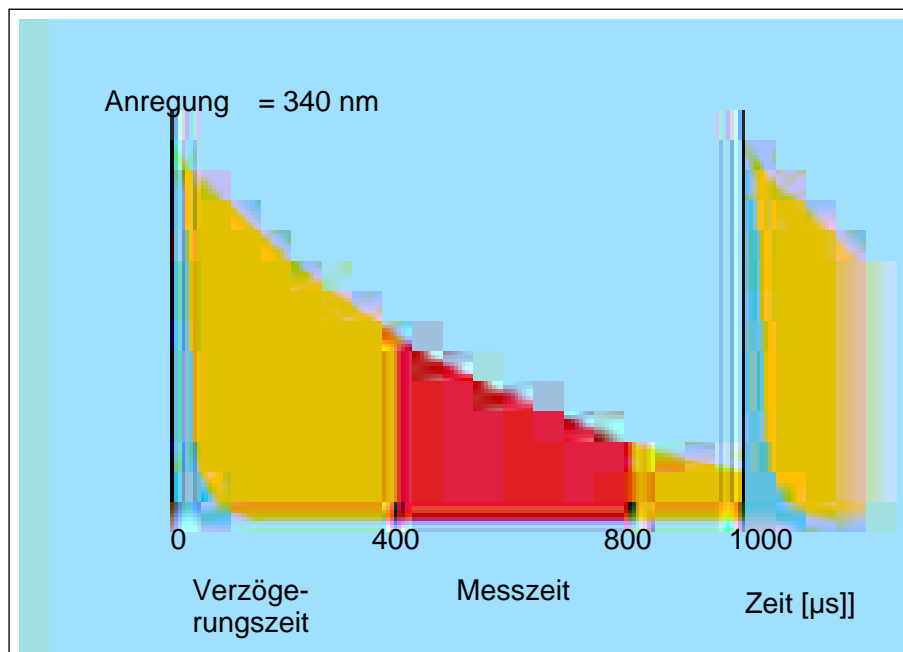


Abb. 9: Prinzip der zeitauflösenden Fluoreszenzmessung. Die Messung von Europium erfolgt nur im Bereich von 400-800 μs (roter Bereich). Zu diesem Zeitpunkt ist die Fluoreszenz anderer mitangeregter Fluorophore (blau dargestellt) bereits abgeklungen und es wird nur noch die Europium-Fluoreszenz (gelb dargestellt) detektiert [modifiziert nach [184]].

3.5.9.2 Zytotoxizitäts-Test: Ansatz

Es wurden je 100 µl Effektorzellen zu 100 µl 1×10^4 Targetzellen gegeben. Die Zellen wurden dabei in Effektor : Target Ratios von 120:1 bis 3:1 eingesetzt. Zusätzlich wurden Wells mit Targets ohne Killer (100 µl Medium) für die Bestimmung der spontanen Freisetzung und Targets mit 0,9 % Triton-X 100 (in Medium) zur Bestimmung der maximalen Freisetzung angesetzt. Der Ansatz wurde eine Minute bei $250 \times g$ zentrifugiert um einen schnellen Kontakt von Target- und Effektorzellen zu gewährleisten und für 2h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde ein Aliquot des Überstands abgenommen und gemessen.

3.5.9.3 Messung des freigesetzten Europiums

Je 20 µl Überstand wurden in 200 µl Verstärkerlösung in Flachboden-Mikrotiterplatten pipettiert, mit Folie abgeklebt und 5' geschüttelt. Die Verstärkerlösung enthält verschiedene Chelatbildner, welche die Fluoreszenz des Eu-DTPA verstärken (vgl. Abb. 8). Zur Messung wurde die Folie entfernt und die Multiwell-Platte mit einem TECAN-Spectrafluor gemessen. Die spezifische Europium-Freisetzung in Prozent ist ein Maß für die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen und wird wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{gemessene Eu-Freisetzung} - \text{spontane Eu-Freisetzung}}{\text{maximale Eu-Freisetzung} - \text{spontane Eu-Freisetzung}}$$

Parameter für die Messung von Europium am SpectraFluor:

Integrationsparameter

Integrationszeit = 400 µs
Integrationsstart = 400 µs
Anzahl der Blitze = 35
manuelles Gain 210 (maximaler Wert soll bei 20.000 counts liegen)

Filter

Anregungswellenlänge = 340 nm
Emissionswellenlänge = 615 nm
Messung von oben

3.6 Transplantation von gezüchteten Rattenhautstücken

Sämtliche Transplantation wurden von Frau Dr. Martina Seifert durchgeführt.

3.6.1 Transplantation von *in vitro*-generierten Hautschichten ohne ein unterstützendes Trägermaterial

Rattenkeratinozyten wurden sieben bis zehn Tage kultiviert, bis das Gewebe mehrschichtig gewachsen war. Anschließend erfolgte die Ablösung der Hautschichten aus der Kulturschale durch Dispase und das Gewebe wurde auf ein vasilinisiertes Gasegewebe (Adaptic™) aufgebracht. Die so prozessierten Hautstücke wurden dann mit der Gase nach oben auf den dorsalen Muskel von Lewis-Ratten transplantiert. Hierfür wurde ein ca. 1 cm großes Areal auf dem Rücken des Tieres bis hinab zur Muskelfaszie ausgeschnitten und eine Fusenig-Transplantationskammer eingesetzt, um die Einwanderung von Zellen aus der Empfängerhaut zu verhindern. Anschließend wurde das Transplantat in Ringer-Laktatlösung aufgebracht, die Kammer mit einer Silikonkappe verschlossen und die Wunde mit einem Wundverband (Tegaderm™ und elastische Binde) abgedeckt. Die Gase wurde entweder sofort, oder nach sechs bis sieben Tagen entfernt. Das Transplantat wurde frühestens 14 Tage nach Transplantation entnommen und histologisch analysiert.

3.6.2 Transplantation von auf Hyaluronsäuremembran ausgesäten Keratinozyten

Zur Stabilisierung der *in vitro*-generierten Hautstücke wurden die Zellen subkonfluent (3-4d) als auch konfluent (7-10d) auf Hyaluronsäuremembranen (Laserskin™) kultiviert. Die verwendete Membran enthält Löcher, die ein Durchwachsen der Zellen ermöglicht. Die so bewachsene Membran muss nicht durch enzymatischen Verdau aus der Kulturschale abgelöst werden - nach der Kultur ist ein direktes Aufbringen des Transplantats möglich.

3.6.3 Histologische Analytik

Um den Erfolg der Transplantation zu überprüfen, wurden von dem entnommenden Transplantat Paraffinschnitte und/oder Kryostatschnitte angefertigt. Es erfolgte die Visualisierung der Zellkerne durch HE- (Hämatoxylin-/Eosin) Färbung; ferner erfolgte ein Zytokeratin-Nachweis mittels APAAP- (alkalische Phosphatase - anti-alkalische Phosphatase) Methode.

4 Ergebnisse

4.1 Erste Generierung MHC-I-"downregulatorischer" Proteine:

Das anti-Ratten-MHC-I- (RT1.A) Intrabody-Konstrukt Ox18Fab

4.1.1 *In vitro*-Translation des Intrabody-Konstrukts

Als erstes MHC-I-"downregulatorisches" Protein wurde der Ox18Fab-Intrabody kloniert. Das Konstrukt besteht aus den beiden Ketten VHCH1 und VLCL des OX-18-Antikörpers in einem bicistronischen Vektor. Vor Herstellung des Fab-Intrabodies konnte durch Papainspaltung des parentalen Antikörpers und nachfolgender FACS-Analytik ermittelt werden, dass das OX-18-Fab-Fragment eine ausreichende Affinität zum Ratten-MHC-I-Molekül besaß.

Um nachzuweisen, dass das synthetisierte Konstrukt einen "open reading frame" besitzt, d.h. vom Start- bis zum Stoppcodon durchgängig abgelesen wird, wurde eine *in vitro*-Translation, d.h. ein *in vitro*-System, das alle Komponenten zur Translation eines Proteins enthält, durchgeführt. Diese Experimente waren nötig, da bei der Klonierung z.B. Fehler aufgetreten sein könnten, die eine Entstehung von Stoppcodons innerhalb der Sequenz zur Folge haben könnten.

Ferner sollte die Funktionalität der IRES-Sequenz untersucht werden. Nach der Translation sollten zwei Ketten detektierbar sein. Schwere und leichte Kette sollten ein unterschiedliches Molekulargewicht besitzen, so dass bei Translation des Ox18Fab Konstrukts zwei Ketten unterschiedlicher Größe zu erwarten waren. In jedem Fall sollte sich die leichte Kette des Ox18FabKDEL von der des Ox18Fab unterscheiden, da hier die leichte Kette die zusätzliche Retentionssequenz (SE)KDEL enthält.

Abbildung Abb. 10 zeigt, dass beide Ketten in der richtigen Größe sowie in gleich großer Menge translatiert wurden (Größe von Fd-Fragment/leichter Kette 25 kD). Es zeigt sich, daß die leichte Kette glykosyliert und somit schwerer als die schwere Kette ist; da beide Konstrukte die gleiche schwere Kette besitzen, sich in der leichten Kette jedoch um die KDEL-Sequenz unterscheiden. Die leichte Kette mit dem Retentionssignal hat ein höheres Molekulargewicht (theor. 0,72 kD).

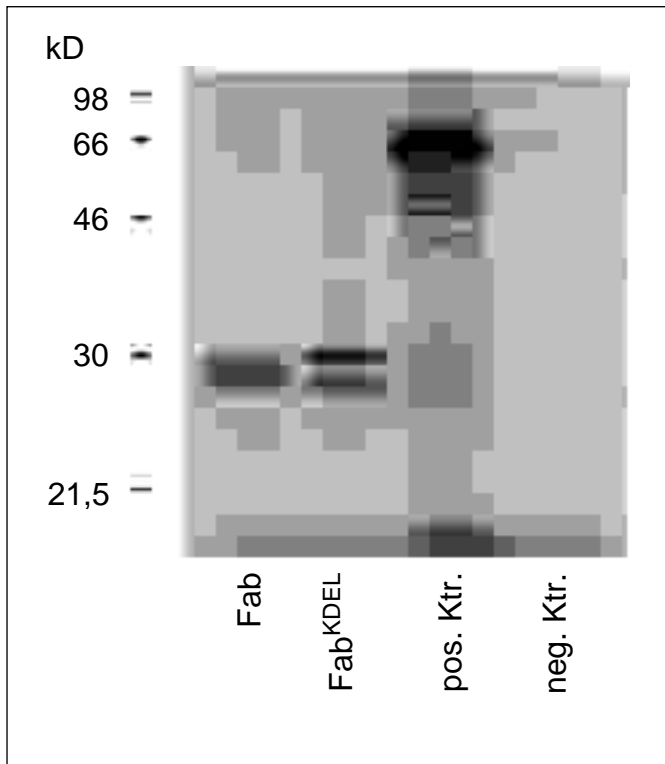


Abb. 10: In vitro-Translation von pCMV-Ox18Fab und pCMV-Ox18FabKDEL. Als Positivkontrolle für die Funktionalität des Tests wurde die im Kit enthaltenen Luzi-ferase-Kontrolle, als Negativ-Kontrolle wurde H₂O eingesetzt.

4.1.2 Bestimmung der Nukleinsäuresequenz des anti-RT1.A-Intrabodies

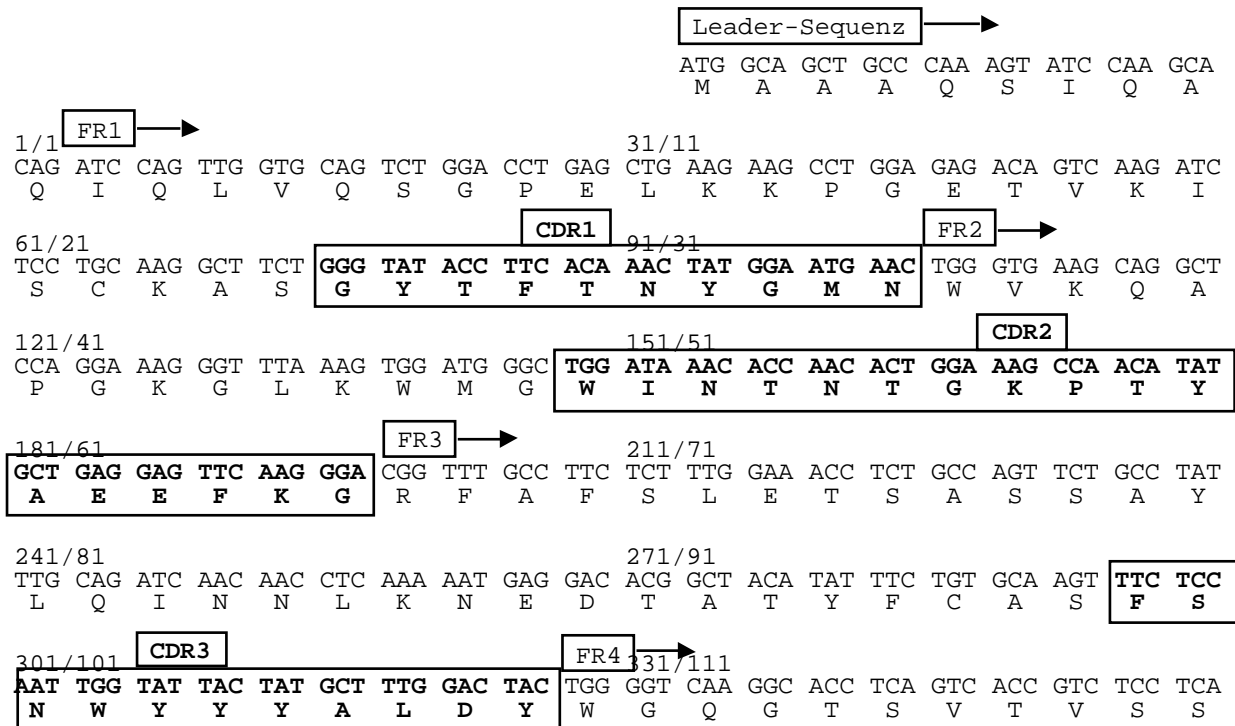
Nach der *in vitro*-Translation der Ox18-Intrabody-Konstrukte wurden diese sequenziert. Da die Sequenz des parentalen Antikörpers OX-18 nicht publiziert war, musste das synthetisierte Konstrukt mit den Sequenzen anderer Immunoglobuline verglichen werden. Die Sequenz wurde anschließend mit Hilfe des BLAST-Programms mit den Sequenzen anderer Proteine der NCBI- (National Center for Biotechnology Information) Datenbank verglichen, um nachzuweisen, dass funktionelle Immunoglobulinfragmente synthetisiert wurden. Außerdem können so ungewöhnliche Charakteristika der Sequenz, die durch Fehler bei der Klonierung oder Sequenzierung aufgetreten sein könnten, identifiziert werden.

Es zeigte sich, dass tatsächlich Antikörperfragmente kloniert wurden, die eine Homologie von bis zu 95% zu anderen Antikörpern aufwiesen (vgl. Abschnitt 4.1.2.3).

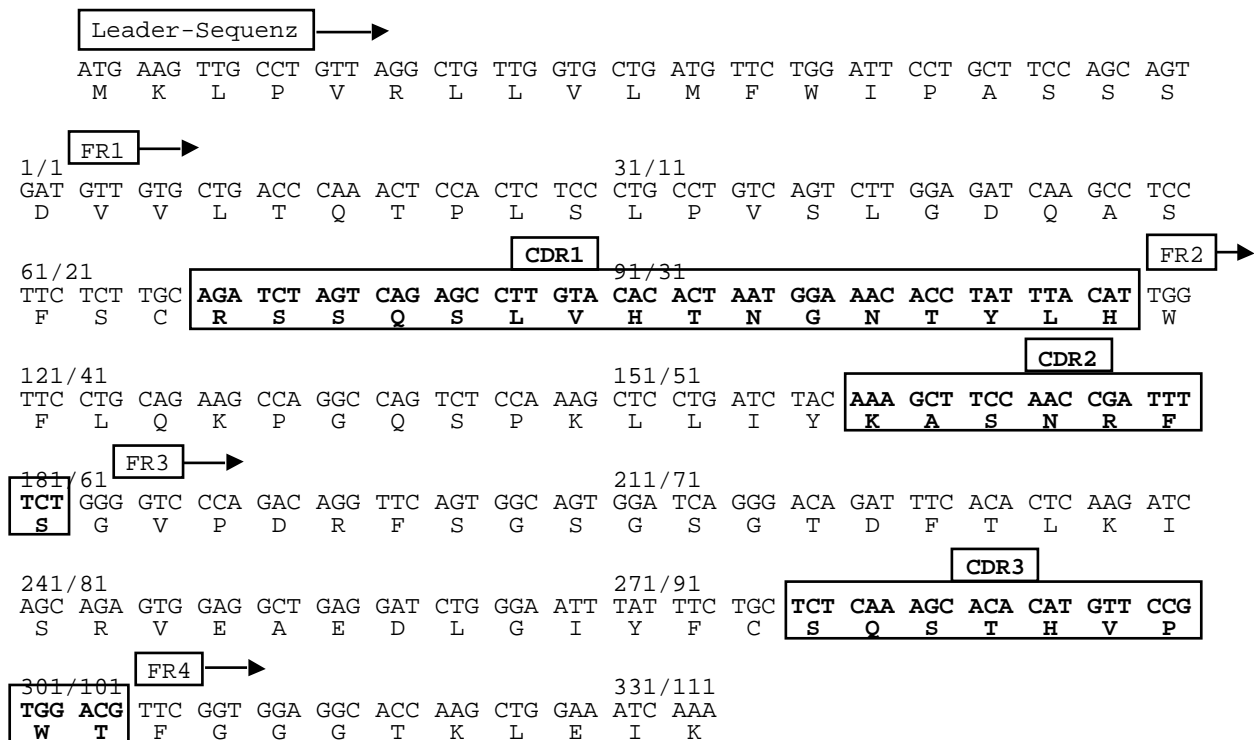
Ferner wurde gemäß dem Kabat/Chothia-Nummerierungs-Schema für Antikörper [185, 186] die Struktur der Antikörperfragmente, d.h. die Lokalisation der CDR- (complementary determined regions) bzw. der Framework-Bereiche determiniert.

Dargestellt sind die Sequenzen beider Antikörperketten, sowie die CDR- und Framework-Bereiche (FR).

4.1.2.1 DNA-Sequenz der variablen schweren Kette des Ox18-Intrabodies:



4.1.2.2 DNA-Sequenz der variablen leichten Kette des Ox18-Intrabodies:



4.1.2.3 Vergleich mit anderen Immunoglobulinen

Es konnten sehr viele homologe Proteine gefunden werden, bei denen es sich ausnahmslos um Immunglobulinfragmente handelte. Dies beweist, dass tatsächlich funktionelle Antikörperfragmente kloniert wurden. Es ist jeweils nur ein Homologievergleich für jede Kette aufgeführt. Die CDR sind fett dargestellt.

```
gi|346881|pir||B42848  L6 mAb heavy chain variable region - mouse (fragment)
Score = 551 (249.5 bits), Expect = 1.6e-66, P = 1.6e-66
Identities = 103/120 (85%), Positives = 109/120 (90%)
```

Ox18VH.: 1 QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFT**NYGMN**NWVKQAPGKGLKWMGW**INTNTGKPTY** 60
 |||||
 B42848 : 1 QIQLVQSGPELKKPGETVKISKASGYTFT**NYGMN**NWVKQAPGKGLKWMGW**INTYTGQPTY** 60
 Ox18VH.: 61 **AEEFKGR**FAFSLETSASSAYLQINN**LKNED**TATYFCAS**FSN**WY**YYALDY**WGQGSVTVSS 120
 |||||
 B42848 : 61 **ADDFKGR**FAFSLETSAYTAYLQINN**LKNED**MATYFCAR**FSY**GN**SR**YADYWGQGTTLTVSS 120
 |||||

1. gi|110364|pir||C34904 Ig kappa chain precursor V region (3-24) - mouse
Score = 577 (263.7 bits), Expect = 7.5e-71, P = 7.5e-71
Identities = 107/112 (95%), Positives = 111/112 (99%)

```
Ox18VL.:   1 DVVLTQTPLSLPVS LGDQASFSCRSSQS LVHTNGNTYLHWFLQKPGQSPKLLIYKASNRF 60  
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||  
C34904 : 20 DVVMTQTPLSLPVS LGDQASFSCRSSQS LVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRF 79  
  
Ox18VL.:  61 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK 112  
          ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||  
C34904 : 80 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYFCSQSTHVPWTFGGGTKLEIK 131
```

Auffallend ist die große Divergenz zwischen der CDR3 der schweren Kette und denen anderer Immunoglobuline. Auch eine erneute Suche nach nur dieser Domäne zeigte, dass es sich um eine höchst ungewöhnliche Sequenz handelt. Es wurden nur zwei identische bzw. ähnliche Sequenzen gefunden:

1. gi|346881|pir||B42848 L6 mAb heavy chain variable region - mouse
(fragment)

```
CDR3 VH      :      1 FSYGNSRYADY 11
                |||||
B42848       :      99 FSYGNSRYADY 109
```

2. gi|479444|pir||S33905 Ig heavy chain precursor V region (V-Dsp2.2-J2-C)
- mouse

```
CDR3 VH      :      1 FSYGNSRYADY 11
                |||||
S33905       :     118 FSYGNSRYSDY 128
```

4.1.3 Expression von anti-RT1.A-Fab-Intrabodies in COS-1-Zellen

Zur Expression des Intrabody-Proteins in eukaryotischen Zellen wurden zunächst COS-1-Zellen gewählt, da diese leicht transfizierbar sind und das große T-Antigen besitzen, das durch Bindung im SV40 ori-Bereich (im pRC/CMV-Vektor enthalten) zu verstärkter Replikation des Plasmids führt. So besteht die Möglichkeit, schon eine transiente Expression des Proteins nachzuweisen. COS-1-Zellen wurden mit den Ox18-Intrabody-Konstrukten mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Methode transfiziert.

Abb. 11 zeigt, daß das Intrabody-Protein auch in eukaryotischen Zellen exprimiert wird, wenn auch schwach. Dies beweist neben dem Vorhandensein eines offenen Leserahmens (vgl. Abschnitt 4.1) die Stabilität der mRNA in eukaryotischen Zellen. Beide Konstrukte werden im endoplasmatischen Retikulum zurückgehalten. Im Kulturüberstand sind keine Intrabody-Fragmente erkennbar.

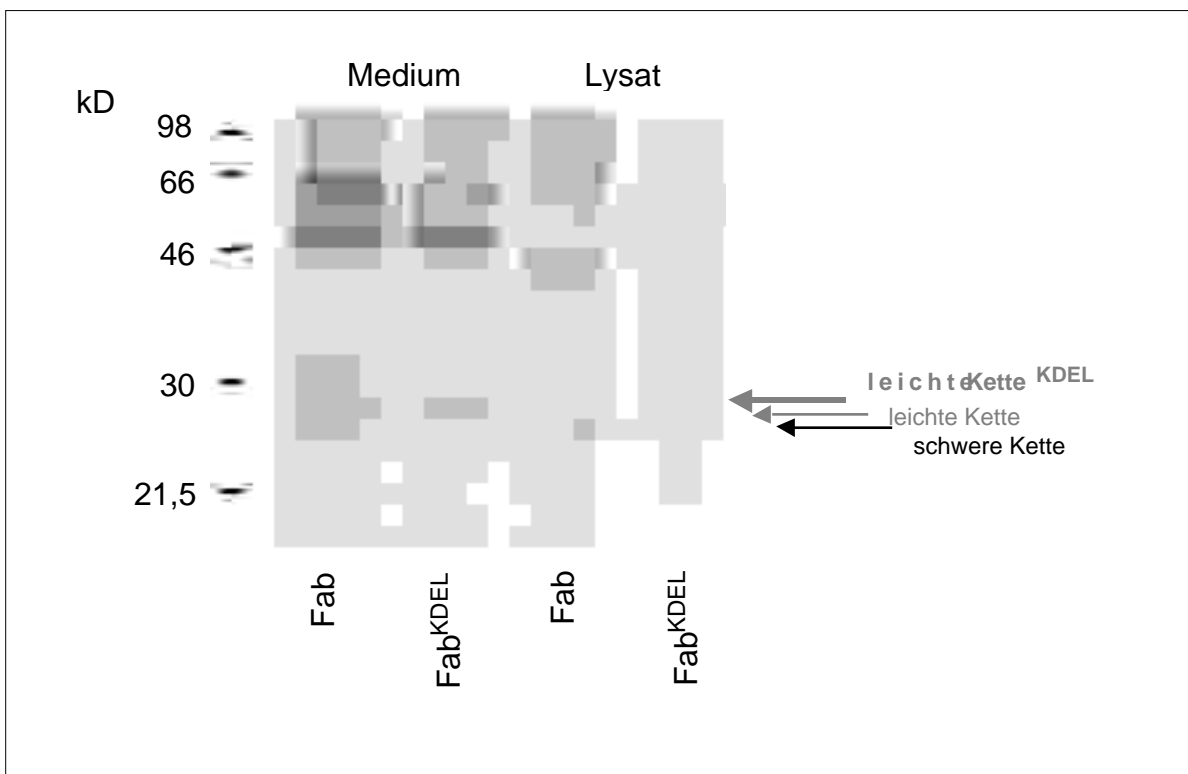


Abb. 11: Immunopräzipitation der exprimierten Proteine Ox18Fab und Ox18FabKDEL in COS-1-Zellen. In Reihe 1 und 2 wurden Maus-Immunglobuline des (serumfreien) Mediums präzipitiert, in Reihe 3 und 4 Maus-Immunglobuline bzw. -Immunglobulinfragmente des Zelllysats.

4.1.4 Stabile Expression von anti-RT1.A-Fab-Intrabodies in NBT-II-Zellen

Um die Funktionalität der Ox18Fab-Intrabodies zu ermitteln, d.h. die MHC-I-Retentionskapazität, wurde zunächst die Rattenepithelzelllinie NBT-II mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert und auf ihre RT1.A-Expression auf der Zelloberfläche mittels FACS-Analytik untersucht. Obwohl 48h nach Transfektion keine Veränderung der RT1.A-Expression zu verzeichnen war, wurden mittels G418-Selektion stabile Zellklone generiert. Es bestand die Möglichkeit, dass nur ein sehr geringer Prozentsatz der Zellen transfiziert worden war und diese in der Gesamtpopulation nicht detektierbar waren.

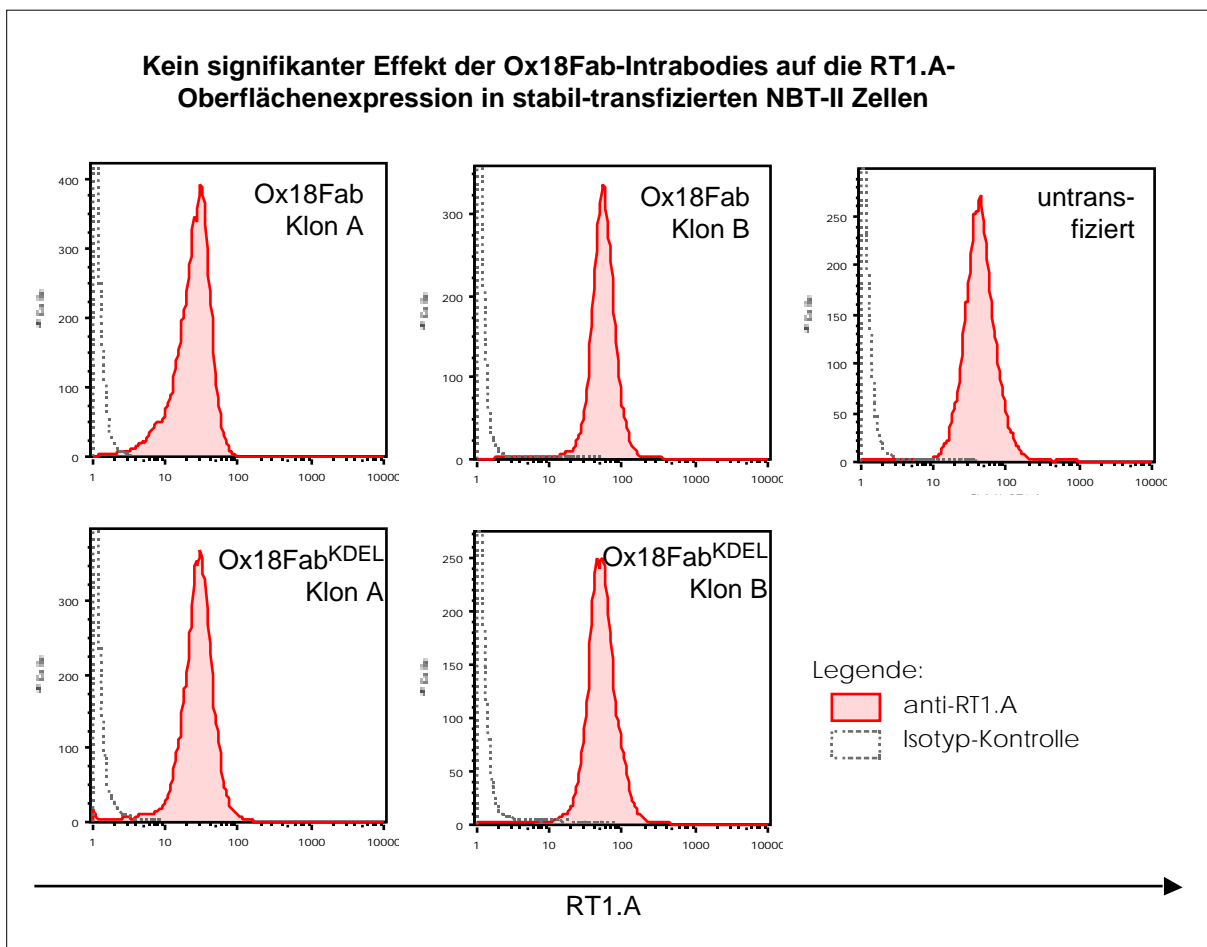


Abb. 12: Stabil-Ox18Fab- bzw. Ox18FabKDEL-exprimierende NBT-II Zellklone. Selektion der Einzelklone durch G418. Keiner der selektierten Klone zeigt eine signifikante Reduktion der MHC-I-Expression.

Nach Selektion der Einzelklone zeigte sich jedoch, dass keine ausreichende Reduktion der RT1.A-Oberflächenexpression erreicht wurde. Nur wenige Klone zeigten überhaupt eine Reduktion, während der größte Teil der Klone eine unveränderte RT1.A-Expression aufwies. Da dies nur eine erste Beurteilung der Funktionalität der Intrabody-Konstrukte war, wurden keine Kontrollkonstrukte, wie z.B. unspezifische Intrabodies, eingesetzt. So konnte nicht entschieden werden, ob die Reduktion, die einzelne Klone zeigten, tatsächlich durch die Expression der Ox18-Intrabodies bewirkt wurde, oder ob nur aus der Gesamtpopulation, die eine Bandbreite verschieden stark RT1.A-exprimierender Zellen enthält, schwächer exprimierende Zellen isoliert wurden. Abb. 12 zeigt vier der über 150 isolierten Klone. Bei keinem Klon wurde eine deutliche Reduktion der RT1.A-Oberflächenexpression detektiert, keinesfalls jedoch ein phänotypischer "knock-out".

4.2 Zweites MHC-I-"downregulatorisches" Protein:

Das anti-human-MHC-I-Intrabody-Konstrukt 8KsFv

Da mit dem Ox18-Intrabody Konstrukt keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde mit dem anti-human-MHC-I- (8KsFv) Intrabody weitergearbeitet, um das Prinzip zu überprüfen. Hierbei wurde zunächst das von Abner Mhashikar (Arbeitsgruppe von Wayne Marasco, Boston) klonierte Konstrukt pCMV-8KsFv auf seine Funktionalität in 293-Zellen untersucht. Weiterhin wurde es in einen adenoviralen Vektor umkloniert und primäre humane Keratinozyten mit dem Konstrukt infiziert.

293-Zellen sind sehr gut transfizierbar und somit kann eine große Menge an Intrabody-DNA integrieren. Damit ist eine hohe Intrabody-Expression gewährleistet. Außerdem besitzen 293-Zellen eine relativ geringe konstitutive MHC-I-Expression, so dass keine extrem hohe Expression an Intrabody-Molekülen erforderlich ist.

4.2.1 Expression von anti-human-MHC-I-Intrabodies in 293-Zellen

293-Zellen wurden mit Hilfe der Kalzium-Phosphat-Methode mit dem Plasmid pCMV-8KsFv transfiziert und die transiente MHC-I-Oberflächenexpression mittels FACS-Analytik bestimmt (vgl. Abb. 13). Nachdem hier eine deutliche Reduktion der MHC-I-Expression gemessen werden konnte, wurden Einzelklone durch G418-Selektion generiert und ebenfalls analysiert. Auch konnten reduziert MHC-I-exprimierende Klone detektiert werden; einige Klone besaßen sogar einen MHC-I-"knock-out"-Phänotyp.

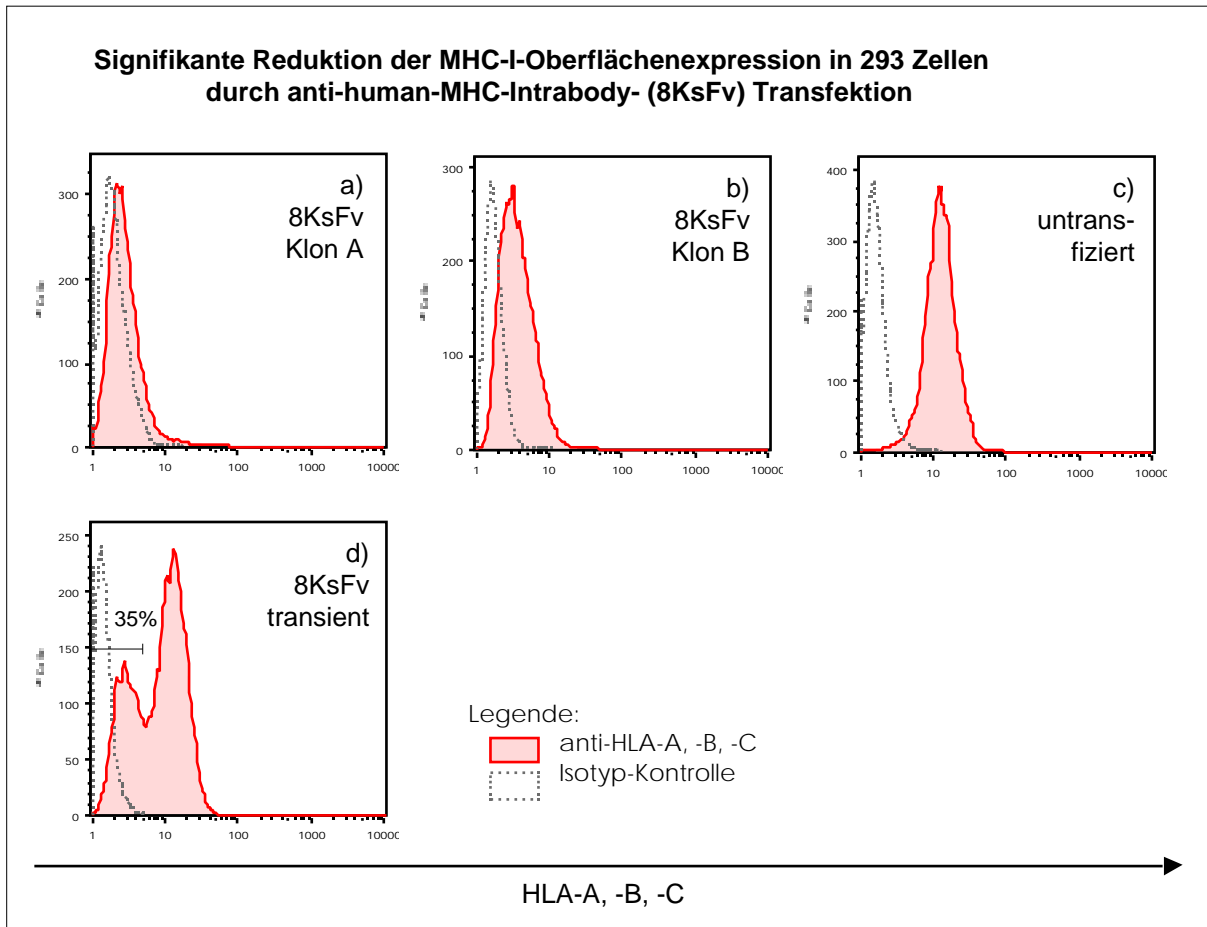


Abb. 13: Stabile bzw. transiente 8KsFv-Intrabody-Expression in 293-Zellen. FACS-Analyse der MHC I Expression. Neben der starken MHC-I-"Downregulation" bei stabilen Klonen zeigten 35% der Zellen schon 48h post-Transfektion eine signifikant verminderte MHC-I-Oberflächenexpression.

4.2.2 Expression von anti-human-MHC-I-Intrabodies in humanen Keratinozyten durch Adenovirus-Infektion

Da primäre humane Keratinozyten nur schwer mit den gängigen Methoden transfizierbar sind, wurden sie mit einem 8KsFv-Konstrukt enthaltenen Adenovirusvektor (Ad-8KsFv) infiziert, der zuvor hergestellt wurde (vgl. Abschnitt 3.5.6).

Es konnte ein großer Teil der Zellen infiziert werden, die einen MHC I herunterregulierten Phänotyp zeigten (vgl. Abb. 14). Ein kleiner Anteil der Zellen zeigte bei dem -Gal-enthaltenden Adenovirus-Kontrollvektor ebenfalls eine Herunterregulation der MHC-I-Oberflächenexpression. Dieses Phänomen wurde auch bei vielen Zelllinien beobachtet und ist Resultat der Adenovirus-Infektion, wenngleich der Mechanismus unklar ist.

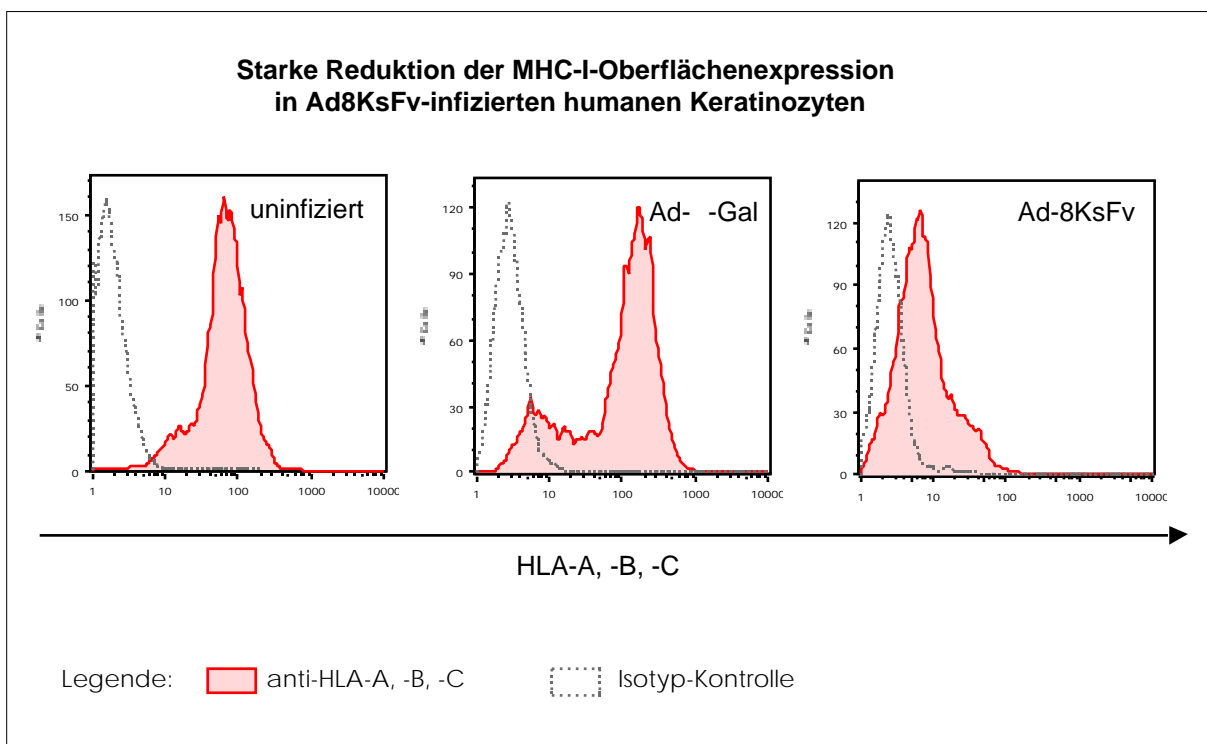


Abb. 14: Adenovirus-Infektion von humanen Keratinozyten mit 8KsFv-Intrabody bzw. -Gal-Kontrollkonstrukt. FACS-Analyse der MHC-I-Expression.

4.3 Dritte Generation der MHC-I-"downregulatorischen" Proteine:

Das anti-RT1.A-Intrabody-Konstrukt als single chain: Ox18sFv

Da mit dem 8KsFv-Intrabody recht gute Resultate erzielt wurden, wurde nun auch das anti-Ratten-MHC-I- (Ox18Fab) Konstrukt als single chain kloniert und wieder in NBT-II Zellen transfiziert.

4.3.1 stabile Expression von anti-RT1.A-sFv-Intrabodies in NBT-II Zellen

Die Ergebnisse waren enttäuschend. Stabile und transiente Expression des Ox18sFv-Intrabodies in den Rattenepithelzellen ergaben das gleiche Resultat wie schon die Transfektion mit dem Fab-Intrabody. Da die Histogramme der FACS-Analyse denen der Ox18Fab-Transfektion glichen, werden hier keine separaten Ergebnisse aufgeführt.

4.4 Die Lösung:

MHC-I-"downregulatorische" Proteine als GFP-Fusionsproteine

In keinen der bisher durchgeführten Experimente konnte definitiv nachgewiesen werden, dass die MHC-I-"Downregulation" tatsächlich durch den Intrabody verursacht wurde. Auch toxische Proteine beeinträchtigen beispielsweise den physiologischen Zustand der Zelle und können so zu einer veränderten Expression induzierbarer/regulierbarer Rezeptoren führen, wie die von ICAM-1 oder der Haupthistokompatibilitätsantigene HLA Klasse I und II.

Durch die Fusion der Intrabodies mit dem GFP können sowohl Aussagen über die Transfektionseffizienz gemacht werden, d.h. wieviele Zellen das Transgen exprimieren, als auch im FACS selektiv die grün-fluoreszierenden Zellen auf ihre MHC-I-Expression untersucht und mit den übrigen Zellen verglichen werden.

4.4.1 Expression von GFP-Fusionsproteinen in Rattenkeratinozyten: Ox18sFv und p19

Zum Zeitpunkt der Fertigstellung der GFP-Intrabodies war die primäre Rattenkeratinozytenkultur etabliert. Im Hinblick auf die finale Zielsetzung der Hauttransplantation wurden, ohne Vorversuche mit anderen Rattenzelllinien, sofort primäre Rattenkeratinozyten für die Transfektion der Ox18GFP-Intrabodies eingesetzt.

4.4.1.1 Optimierung der Transfektion von Rattenkeratinozyten

Um eine möglichst hohe Effizienz des Gentransfers zu erreichen, d.h. eine Vielzahl von Kopien des Transgens in die Zelle zu bringen und eine hohe Anzahl an Zellen zu transfizieren, musste die Transfektion der Primärzellen zunächst optimiert werden. Es wurden die Transfektionsmethoden mit Kalziumphosphat, *Superfect*TM (Qiagen) und *DMRIE-C*TM (Life Sciences) getestet. Dabei wurde das in den Vektor pcDNA3.1-Zeo klonierte GFP (pZeo-GFP) zur Detektion eingesetzt.

Die transiente Expression des GFP 48h nach Transfektion zeigte, dass durch Transfektion mit *DMRIE-C*TM die beste Transfektionseffizienz erzielt wurde. Es konnten bei diesem Vorversuch bis zu 20% der Zellen transfiziert werden - bei einer sehr hohen Expression des Gens (starke Grün-Fluoreszenz).

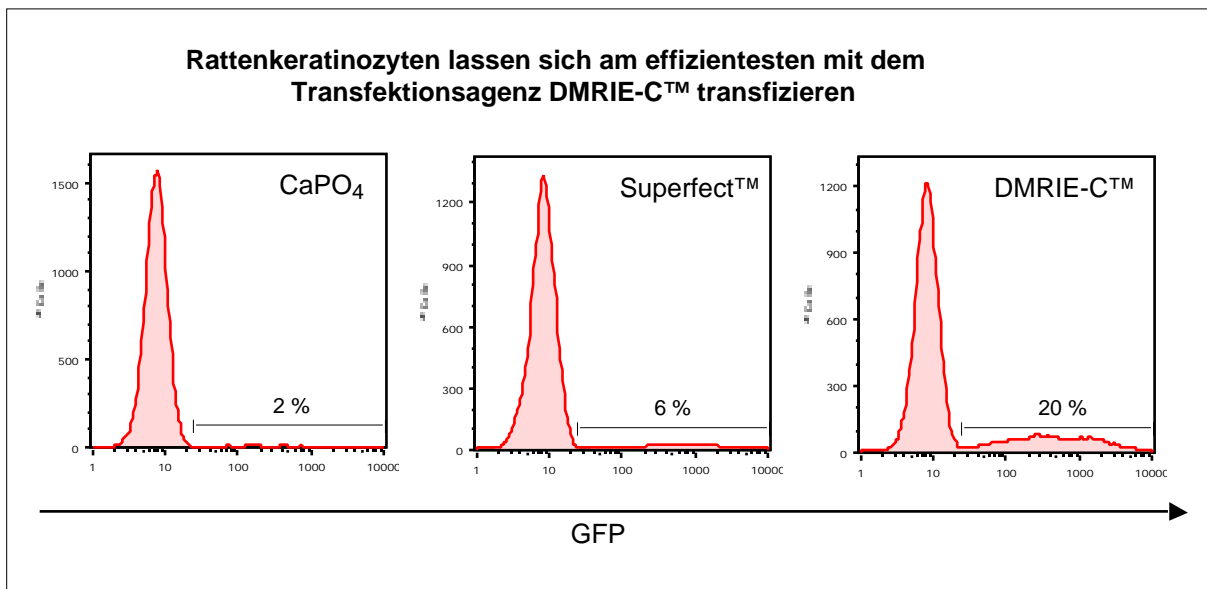


Abb. 15: Transfektion von primären Rattenkeratinozyten mit verschiedenen Transfektionsagensen: Kalziumphosphat-Methode (links) und die beiden liposomvermittelten Transfertechniken mittels SuperfectTM (Mitte) und DMRIE-CTM (rechts). 48h nach Transfektion: FACS-Analyse.

4.4.1.2 Bestimmung der Expression durch Fluoreszenzmikroskopie

Nachdem die Wahl der Transfektionsmethode auf die DMRIE-C™-Methode gefallen war, wurden die Rattenkeratinozyten mit dem in den Expressionsvektor pcDNA3.1-Zeo klonierten GFP-Fusionsintradbody (pZeo-Ox18GFP) transfiziert und stabile Klone durch Zeocin™-Selektion generiert.

Schon bei der Selektion erwies sich das fusionierte GFP als hilfreich. Es konnten dadurch selektiv nur grün-fluoreszierende Klone gepickt und expandiert werden. Dies bedeutet eine enorme Reduktion des Arbeitsaufwandes mit gleichzeitiger Erhöhung der Erfolgchancen (an dieser Stelle sei daran erinnert, dass bei der Selektion der NBT-II Klone über 150 Klone isoliert und analysiert wurden).

Die isolierten Zellklone konnten nach der Selektion in normalem Kulturmedium ohne Zeocin™ weiterkultiviert werden, ohne dass eine Abnahme der Fluoreszenz zu beobachten war.

Abb. 16 zeigt einen Keratinozyten-Klon vor der Isolierung als einzelnes Zellnest (A+B), nach der Isolierung und Expansion (C+D) sowie mit bereits vielschichtigem Wachstum in Kultur (E+F). Die Zellen konnten über viele Passagen (bis über 100) kultiviert werden, ohne dass ein Verlust des exprimierten Gens zu verzeichnen war.

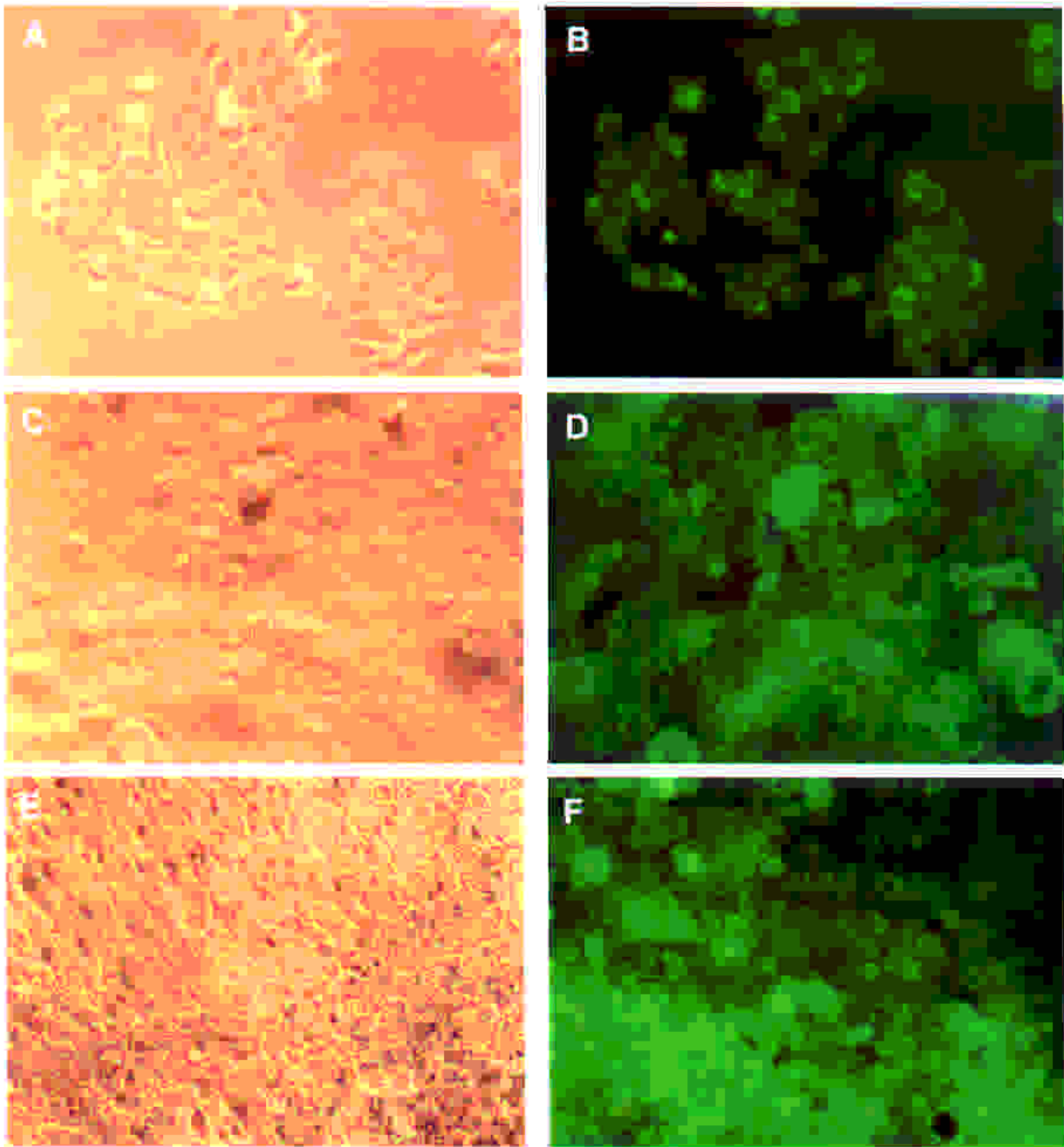


Abb. 16: Ox18sFvGFP-Expression in stabil-transfizierten Rattenkeratinozyten. Links: lichtmikroskopische Aufnahme, 400× Vergrößerung; rechts: der identische Bildausschnitt im Fluoreszenzmodus (Filter = 510 nm). A+B: einzelner Klon; C+D: expandierende Zellen; E+F: mehrschichtiges "Sheet"

4.4.1.3 Bestimmung der MHC-I-Oberflächenexpression mittels FACS-Analytik

Um die GFP-Expression in Korrelation mit der MHC-I-Expression zu setzen, wurden die Zellen mit dem Antikörper des F-16-4-4-11 Hybridoms (kurz: F16), ein anti-RT1.A-Antikörper, der nicht mit dem OX-18-Antikörper identisch ist, gefärbt. Damit sollte gewährleistet sein, dass das MHC-I-Epitop nicht von Ox18-Intrabodies besetzt ist, die nicht im ER zurückgehalten wurden, sondern möglicherweise mit dem RT1.A-Molekül an die Zelloberfläche gelangt sind, und so der anti-RT1.A-Antikörper nicht binden kann. Dies würde zu einem verfälschten Ergebnis führen.

Die Zellen wurden zuerst mit dem F16-Antikörper und danach mit einem PE-markiertem anti-Maus-IgG-Antikörper markiert. Diese sekundäre Färbung gewährleistet eine starke Markierung mit einem resultierenden intensiven Signal der Zellen in der Rot-Fluoreszenz, die benötigt wird, um eine elektronische Kompensation der sehr starken Grün-Fluoreszenz des GFP zu ermöglichen, die sonst in den "roten" Kanal überstrahlt.

Parallel zu dem Ox18sFvGFP-Konstrukt wurden bei der Transfektion der bicistronische Vektor pIE-Ox18sFv, der neben dem Ox18sFv das GFP in der zweiten Kassette des Vektors enthält, und das adenovirale Protein p19 eingesetzt.

Abb. 17 zeigt die deutliche Korrelation zwischen GFP-Fluoreszenz und MHC-I-"Downregulation". Das p19-Protein, welches das humane MHC-I-Molekül und einige Maus-Haplotypen bindet, führt zu keiner Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression in Rattenkeratinozyten, es bindet also zumindest nicht den RT1.Aavl-Haplotyp von DA-Ratten. Das GFP-Fusionprotein ist wesentlich effektiver als der bicistronisch exprimierte Intrabody. Insgesamt kann festgestellt werden, dass eine sehr gute Reduktion der RT1.A-Expression erzielt wurde, die sogar zur Generierung von Zellen mit phänotypischen "knock-out" führte (nicht gezeigt: identische Färbung mit der Isotyp-Kontrolle). Ferner wird deutlich, dass eine bestimmte basale Expression des Intrabodies benötigt wird, um effektiv zu sein: erst bei einer Grün-Fluoreszenz von >110 Einheiten (mittlere Fluoreszenzintensität) tritt eine Reduktion der RT1.A-Expression ein. Als Kontrollkonstrukt wurde der anti-human-MHC-I-Intrabody 8FsFv eingesetzt, der nicht an das Ratten-MHC-Molekül bindet.

Von den transfizierten Keratinozyten konnten Einzelklone generiert werden, die einen RT1.A-"knockout"-Phänotyp zeigten und diesen über die gesamte Kulturdauer beibehielten. Diese Klone wurden weiter charakterisiert (Abschnitt 4.5) und für Funktionstests (Abschnitt 4.6) eingesetzt.

Anti-Ratten-MHC-I (RT1.A)-Intrabodies können expressionsabhängig die RT1.A-Oberflächenexpression auf primären Rattenkeratinozyten stark senken

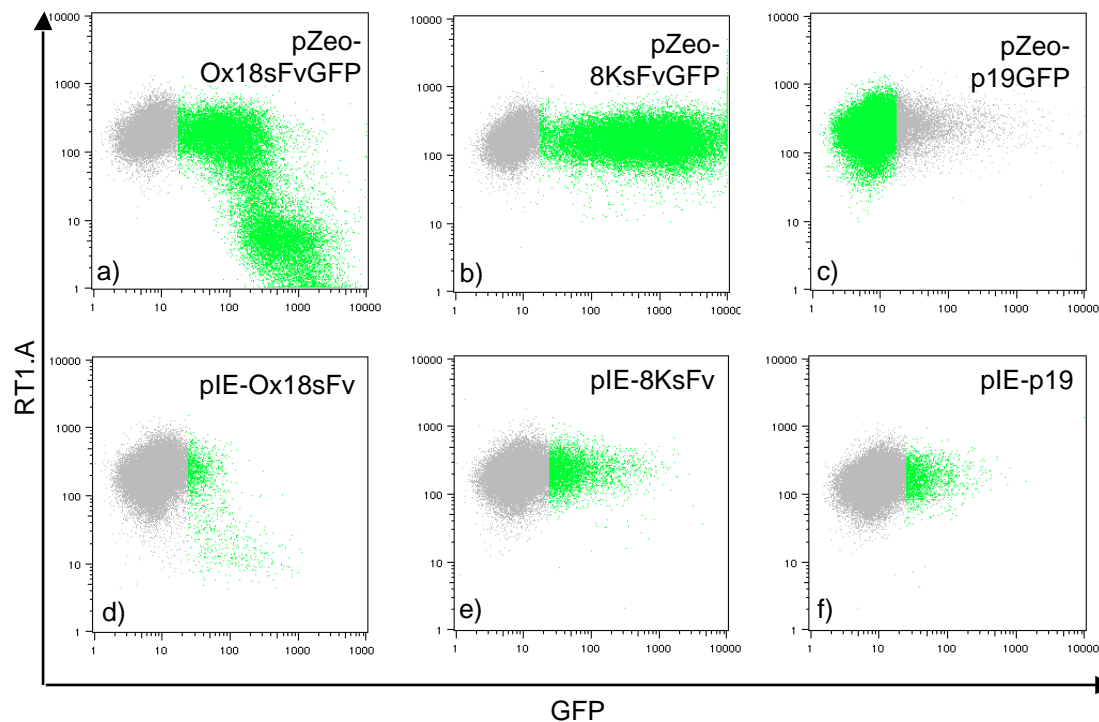


Abb. 17: Primäre Rattenkeratinozyten wurden mit den spezifizierten Konstrukten transfiziert und 48h nach Transfektion im FACS analysiert. Die Ratten-MHC-I- (RT1.A) "Downregulation" kann effizienter durch das GFP-Fusionsprotein erreicht werden (a), als durch den anti-RT1.A- (Ox18) Intrabody allein (d). Diese "Downregulation" ist abhängig von der Stärke der Intrabody-Expression. Die Expression des Kontrollintrabodies (anti-human-MHC-I-Intrabody, 8KsFv) führt zu keiner Reduktion der RT1.A-Oberflächenexpression (b+e). Das adenovirale Protein p19 hat ebenfalls keinen Effekt auf die RT1.A-Expression von DA-Keratinozyten (c+f).

Verwendete Konstrukte:

- GFP-Fusionsproteine, kloniert in den Vektor pcDNA3.1-Zeo
anti-Ratten-MHC-I-Intrabody = Ox18sFvGFP,
Kontroll- (anti-human-MHC-I) Intrabody = 8KsFvGFP,
adenovirales p19-Protein = p19GFP
- Proteine, kloniert in den bicistronischen Vektor pIRES-EGFP (GFP in der zweiten Kasette)
anti-Ratten-MHC-I-Intrabody = pIE-Ox18sFv
Kontroll- (anti-human-MHC-I) Intrabody = pIE-8KsFv,
adenovirales p19-Protein = pIE-p19

4.4.2 Expression von GFP-Fusionsproteinen in humanen 293-Zellen: 8KsFv und p19

Nachdem mit dem anti-Ratten-MHC-I- (RT1.A) Intrabody-Konstrukten gute Ergebnisse hinsichtlich der "Downregulation" der RT1.A-Oberflächenexpression erzielt wurden, sollte nun auch der anti-human-MHC-I-Intrabody auf seine Funktionalität bezüglich der Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression untersucht werden. Hierfür wurde die humane Zelllinie 293 analog zu den Rattenkeratinozyten transfiziert und analysiert.

4.4.2.1 Bestimmung der MHC-I-Oberflächenexpression mittels FACS-Analytik

293-Zellen wurden mit der Kalziumphosphat-Methode transfiziert und 48h nach Transfektion analysiert. Die FACS-Analyse zeigt das gleiche Ergebnis wie für die Rattenkeratinozyten (vgl. Abb. 18). Es ist eine deutliche "Downregulation" der MHC-I-Expression beim Einsatz des anti-humanen 8KsFv-Intrabody zu beobachten - im Gegensatz zu dem Ox18sFv-Kontrollantikörper. Hier ist keine Reduktion der MHC-I-Expression zu beobachten, abgesehen von der leichten Minderung der Expression bei stark exprimierenden Zellen. Dieses Phänomen trat schon bei der adenoviralen Infektion von 293-Zellen mit dem - Gal-Kontrollkonstrukt (vgl. Abschnitt 4.2.2) und bei vielen weiteren Transfektionen mit anderen Zelllinien auf und könnte an der Beeinträchtigung des physiologischen Zustands der Zellen durch die starke Expression des Transgens liegen.

Anti-human-MHC-I-Intrabodies können ebenfalls expressionsabhängig die MHC-I-Oberflächenexpression auf 293-Zellen stark senken - sie sind dabei wesentlich effektiver als das adenovirale Protein p19

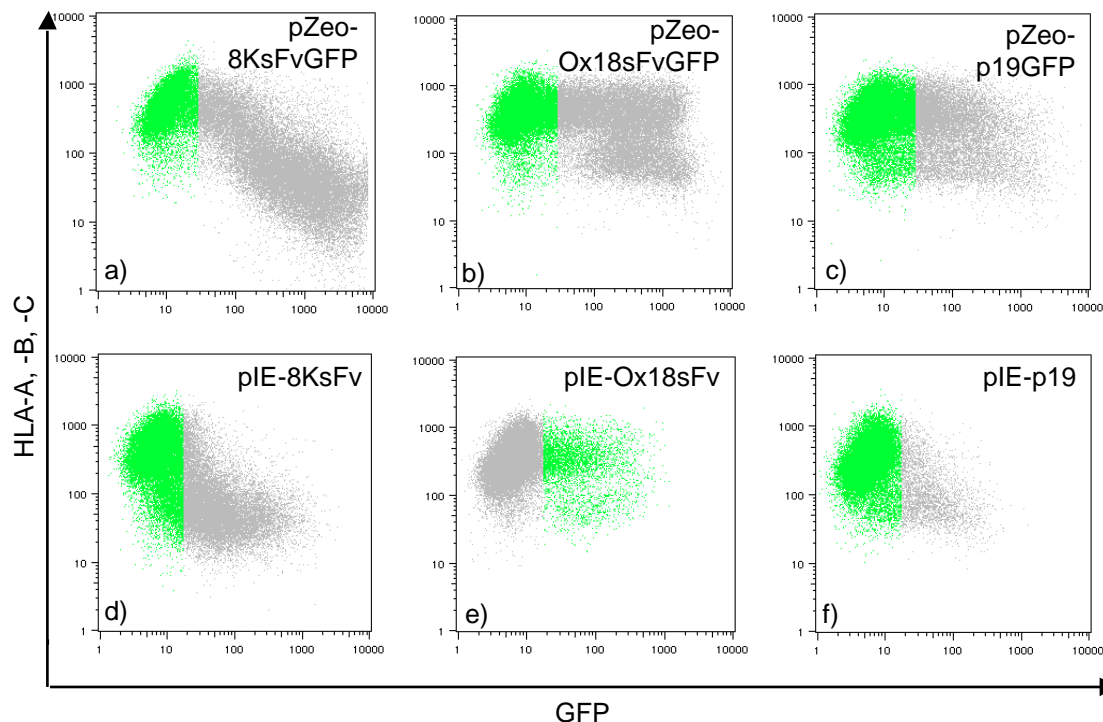


Abb. 18: 293-Zellen wurden mit den spezifizierten Konstrukten transfiziert und 48h nach Transfektion im FACS analysiert. Wie schon für den anti-Ratten-MHC-I-Intrabody gezeigt, kann auch hier eine human-MHC-I-"Downregulation" effizienter durch das GFP-Fusionsprotein erreicht werden (a), als durch den anti-MHC-I- (8KsFv) Intrabody allein (d). Diese "Downregulation" ist ebenfalls abhängig von der Stärke der Intrabody-Expression. Die Expression des Kontrollintrabodies (anti-Ratten-MHC-I-Intrabody, Ox18sFv) führt zu keiner Reduktion der RT1.A-Oberflächenexpression (b+e). Das adenovirale Protein p19 ist nicht so effizient in der MHC-I-"Downregulation" wie das 8KsFv-Konstrukt (c+f).

Verwendete Konstrukte:

- GFP-Fusionsproteine, kloniert in den Vektor pcDNA3.1-Zeo
anti-human-MHC-I-Intrabody = 8KsFvGFP,
Kontroll- (anti-Ratten-MHC-I) Intrabody = Ox18sFvGFP,
adenovirales p19-Protein = p19GFP
- Proteine, kloniert in den bicistronischen Vektor pIRES-EGFP (GFP in der zweiten Kasette)
anti-human-MHC-I-Intrabody = pIE-8KsFv
Kontroll- (anti-Ratten-MHC-I) Intrabody = pIE-Ox18sFv,
adenovirales p19-Protein = pIE-p19

4.5 Charakterisierung Intrabody-exprimierender Zellen

In den folgenden Abschnitten werden die anti-MHC-I-Intrabody-exprimierenden Zellen näher charakterisiert. Erstens wird überprüft, ob andere Oberflächenmoleküle durch die Intrabody-Expression beeinträchtigt werden. Darüber hinaus wird das Schicksal der durch die Intrabodies im ER zurückgehaltenen MHC-I-Moleküle untersucht. Und letztlich wird der Einfluss von Interferon- auf die MHC-I-Expression auf Intrabody-exprimierende Zellen untersucht.

4.5.1 Wird die Expression anderer Oberflächenmoleküle beeinträchtigt?

Bei der Manipulation von Zellen stellt sich immer die Frage, ob neben dem gewünschten Effekt auch noch andere Zellparameter verändert wurden. Die Expression des Transgens sollte weder Nebeneffekte auf den physiologischen Zustand der Zelle haben noch andere Proteine der Zelle verändern oder ihre Expression beeinträchtigen.

Zunächst konnte festgestellt werden, dass weder die Klone der MHC-I-herunterregulierten Rattenkeratinozyten noch die der 293-Zellen Wachstumsnachteile gegenüber untransfizierten Zellen zeigten. Auch die Morphologie der Zellen unterschied sich nicht merklich von der normaler Zellen bis auf die Tatsache, dass sie durch die Akkumulation von GFP-MHC-I-Molekülen in der Zelle lediglich etwas größer und granulärer erschienen. Es konnten mehrschichtige "Keratinozyten-Sheets" gezüchtet werden, die durch Dispase-Behandlung abgelöst und für die Transplantation eingesetzt werden sollten.

Es wurden sowohl konstitutiv exprimierte (z.B. Integrine) als auch regulierbare bzw. induzierbare (z.B. MHC I+II) Rezeptoren bei transient transfizierten 293-Zellen und stabilen Rattenkeratinozytenklonen untersucht. Abb. 19 zeigt, dass sich untransfizierte und transfizierte Zellen in der transienten Expression nicht voneinander unterscheiden und stabile Klone die selbe Morphologie aufweisen wie untransfizierte Zellen.

Durch die transiente Expression von anti-human-MHC-I- (8KsFv) Intrabodies in 293-Zellen werden andere Oberflächenmoleküle nicht beeinflusst

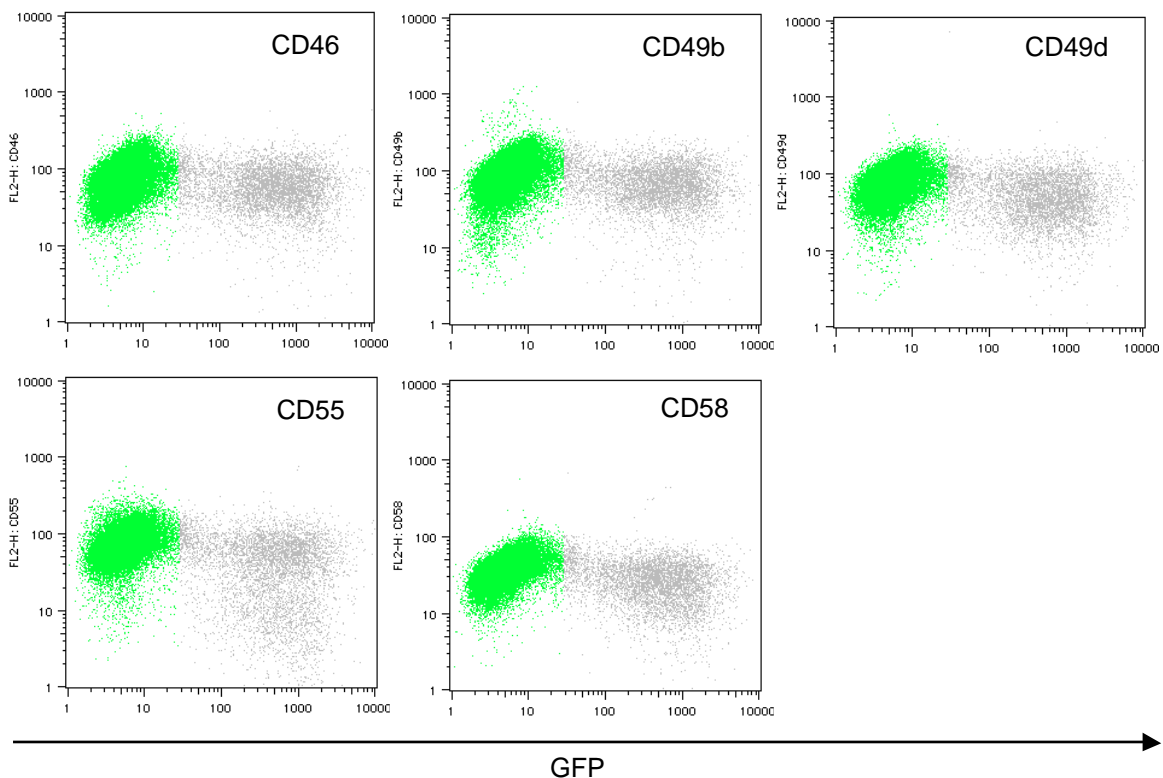


Abb. 19: 293-Zellen wurden mit dem anti-human-MHC-I-Intrabody 8KsFv transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die aufgeführten Oberflächenmoleküle im FACS analysiert. Die Oberflächenexpression der untersuchten Moleküle (CD46, CD49b, CD49d, CD55, CD58) wurde durch die 8KsFv-Intrabody-Konstrukte nicht beeinflusst.

Die Analyse von stabil Intrabody-exprimierenden Rattenkeratinozyten zeigte keine generellen Unterschiede bei der Expression von RT1.B und ICAM-1 (vgl. Abb. 20). Das MHC-Klasse-II-Antigen der Ratte, RT1.B, wird bei Interferon- γ -Stimulation auf Keratinozyten induziert. Der Ox18sFv- (anti-Ratten-MHC-I) transfizierte Klon zeigte eine etwas stärkere Erhöhung als mit dem Kontrollintrabody 8KsFv transfizierte oder untransfizierte Keratinozyten. ICAM-1 exprimieren alle untersuchten Zellen stark; bei allen drei untersuchten Populationen konnte nur eine schwache Erhöhung durch Interferon- γ beobachtet werden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sowohl Intrabody-transfizierte Zellen, als auch untransfizierte Zellen durch Interferon- γ aktivierbar sind und sich bezüglich der untersuchten Antigen-Expression nicht voneinander unterscheiden.

Stabil anti-Ratten-MHC-I- (Ox18sFv) Intrabody-exprimierende Klone zeigen generell keine differente Expression anderer Oberflächenmoleküle gegenüber untransfizierten Rattenkeratinozyten

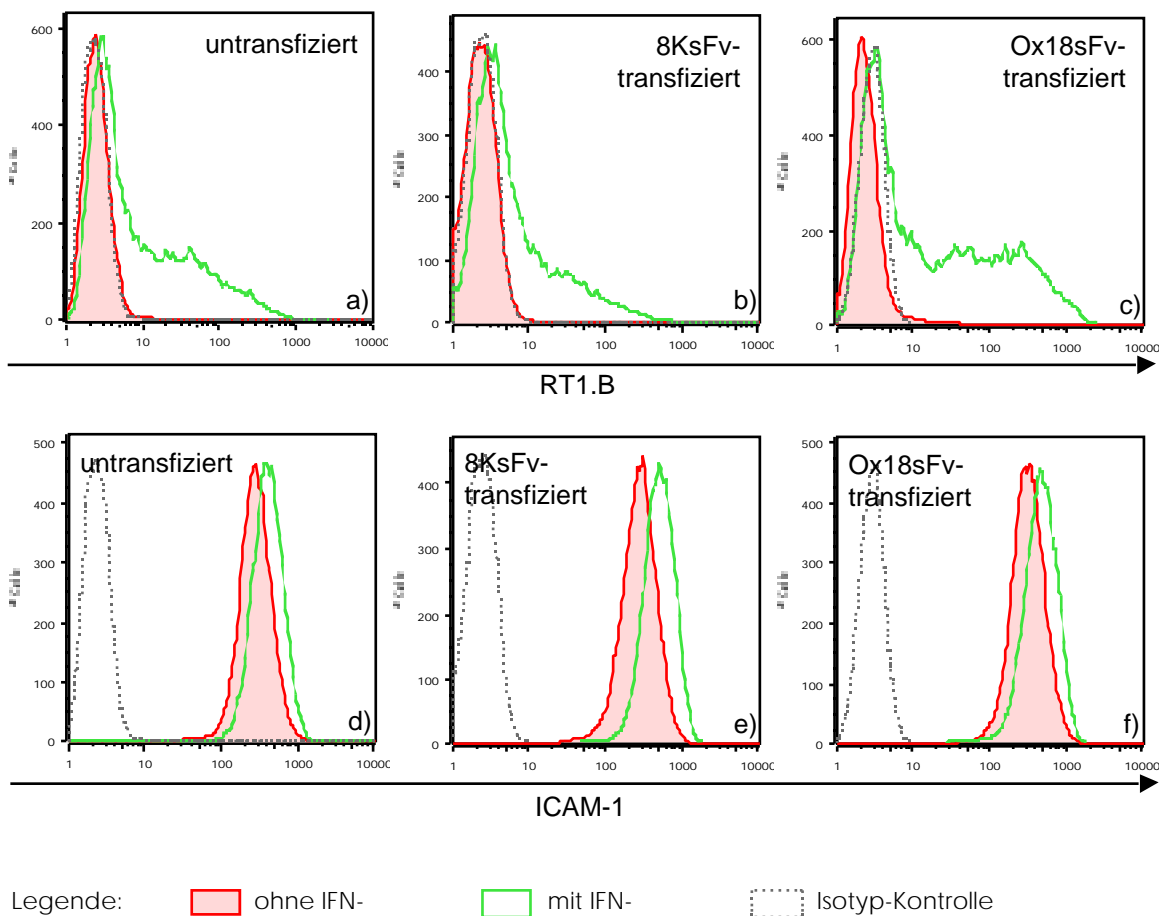


Abb. 20: Rattenkeratinozyten wurden mit den aufgeführten Konstrukten (RT1.B, Ratten-MHC-II & ICAM-1) stabil transfiziert. Generierte Einzelklone wurden 48h mit bzw. ohne 10 ng/ml IFN- kultiviert und anschließend auf die Expression von RT1.B und ICAM-1 durch FACS-Analyse untersucht. RT1.B kann durch Interferon- -Stimulation bei untransfizierten (a), Kontrollintrabody- (8KsFv) transfizierten (b) und anti-Ratten-MHC-I- (Ox18sFv) Intrabody-transfizierten (c) Rattenkeratinozyten ähnlich stark induziert werden. Ebenfalls zeigen sowohl uninfizierte (d) als auch Kontroll- bzw. anti-Ratten-MHC-I-Intrabody-exprimierende (e bzw. f) Keratinozyten eine starke ICAM-I-Expression, was durch Interferon- leicht steuerbar ist.

4.5.2 Was passiert mit den MHC-I-Molekülen in der Zelle?

Für die intrazelluläre Detektion von MHC-I-Molekülen wurden stabil transfizierte 293-Zellen und Rattenkeratinozyten angefärbt. Dabei war darauf zu achten, dass die extrazellulären MHC-I-Moleküle nicht mitangefärbt wurden. Es wurden zwei Verfahren angewendet:

293-Zellen wurden extrazellulär mit einem FITC-gekoppelten anti-MHC-I-Antikörper gefärbt, permeabilisiert und der intrazelluläre Teil an MHC-Molekülen mit einem schwächer konzentrierten PE-markierten Antikörper markiert. Beide Antikörper stammten von dem selben Klon, d.h. sie erkannten das selbe Epitop.

Für die Rattenkeratinozyten stand kein direkt-markierter anti-RT1.A-Antikörper zur Verfügung. Daher wurden vor der intrazellulären Färbung sämtliche Oberflächenmoleküle mittels Papain-Verdau entfernt. Es wurde wieder der F16-Antikörper mit einem PE-markiertem Sekundärantikörper eingesetzt.

Das Schicksal der Intrabody-gebundenen MHC-I-Moleküle ist ungewiss. Fest steht, dass im Laufe der Zeit ein Abbau geschehen muss, da die Zelle ein so großes Ausmaß an intrazellulär akkumulierten Molekülen nicht tolerieren würde. Es könnte sein, dass die Komplexe sofort nach ihrer Bindung ins Zytosol exportiert werden und dort proteolytisch verdaut werden. Denkbar ist aber auch ein negatives "Feedback" auf die MHC-I-Proteinsynthese durch die erhöhte Anzahl von MHC-I-Molekülen in der Zelle. Darüber hinaus ist eine Akkumulation bis zu einem gewissen Ausmaß, das von der Zelle toleriert wird und sicherlich vom Zelltyp abhängig ist möglich. Abb. 21 und Abb. 22 zeigen, dass dies, (zumindest bei den untersuchten 293-Zellen und Rattenkeratinozyten) der Fall ist.

**Das RT1.A-Molekül akkumuliert intrazellulär
in Intrabody-transfizierten Rattenkeratinozyten**

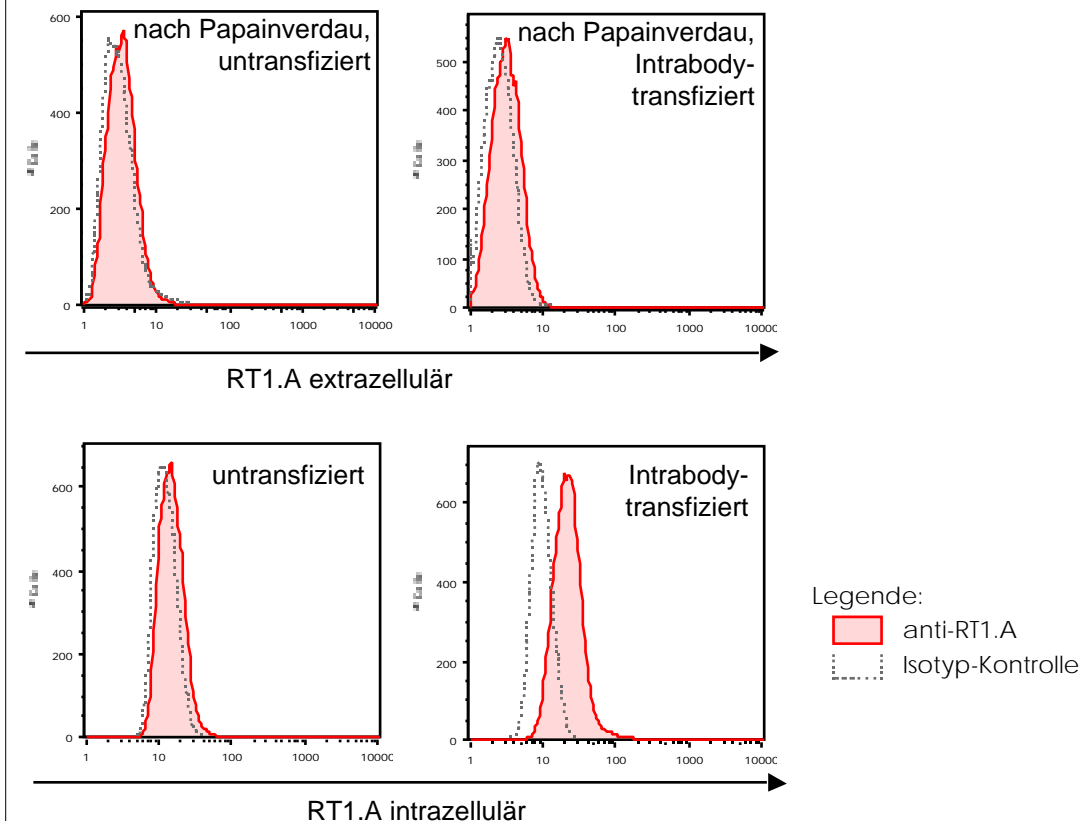


Abb. 21: Vor der intrazellulären Färbung von RT1.A (Ratten-MHC-I) in Rattenkeratinozyten wurden diese mit Papain behandelt. Die beiden oberen Histogramme zeigen die erfolgreiche Entfernung aller RT1.A-Oberflächenmoleküle. Die beiden unteren Histogramme zeigen durch die nachfolgende intrazelluläre Färbung die verstärkte Detektion an intrazellulär lokalisierten RT1.A-Molekülen in anti-RT1.A-Intrabody-transfizierten Keratinozyten (unten, rechts) im Gegensatz zu untransfizierten Zellen (unten, links).

Abb. 22 zeigt am Beispiel der untersuchten 293-Zellen deutlich: je stärker die MHC-I-Reduktion auf der Zelloberfläche ist, desto stärker ist das Ausmaß an intrazellulärer MHC-I-Akkumulation, d.h. Klon A mit reduzierter MHC-I-Oberflächenexpression zeigt eine erhöhte intrazelluläre MHC-I-Färbung - Klon B mit der schwächsten Expression von MHC I auf der Zelloberfläche weist die stärkste intrazelluläre Färbung auf.

**MHC-I-Moleküle anti-MHC-I-Intrabody-transfizierter 293-Zellen
akkumulieren ebenfalls intrazellulär**

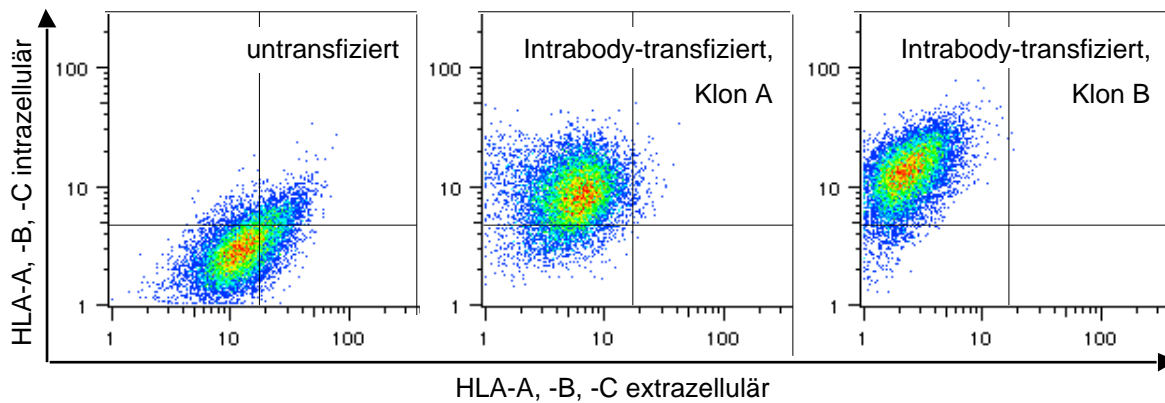


Abb. 22: Stabil anti-MHC-I- (8KsFv) Intrabody exprimierende (Mitte & rechts) sowie untransfizierte (links) 293-Zellen wurden extra- und intrazellulär mit anti-MHC-I -Antikörpern gefärbt und im FACS analysiert. Deutlich wird die verstärkte intrazelluläre Detektion in Intrabody-exprimierenden Zellklonen (Mitte & rechts). In Zellen, welche die stärkste MHC-I-Oberflächenreduktion zeigen, kann die größte Akkumulation an intrazellulären MHC-I-Molekülen detektiert werden (rechts).

4.5.3 Wie wirkt sich Interferon- auf die MHC-I-Expression aus?

Interferon- ist ein proinflammatorisches Zytokin, das die MHC-I-Expression auf Zellen heraufreguliert. Es stellt sich also die Frage, ob auch in Intrabody-exprimierenden Zellen mit phänotypischem MHC I "knock-out" diese Expression wieder durch IFN- -Stimulation gesteigert werden kann.

Zu diesem Zweck wurden untransfizierte sowie stabil-transfizierte Rattenkeratinozyten für 48h mit IFN- stimuliert und auf ihre RT1.A-Expression untersucht. Wie zu erwarten war, steigerte IFN- die Expression auf untransfizierten Keratinozyten. Bei dem Intrabody-exprimierenden Klon wurden zwei Populationen detektiert: eine RT1.A-positive und eine RT1.A-negative Population. Es lag die Vermutung nahe, dass es sich hier um zwei verschiedenen Populationen handelte. Daraufhin wurden die RT1.A-negativen von den RT1.A-positiven Zellen durch Magnetpartikel separiert und nochmals mit Interferon- stimuliert. Es zeigte sich, dass diese separierten Zellen nach erneuter Interferon- -Stimulation keine Reexpression mehr an RT1.A hatten. Dies war auch bei späteren Stimulationen der Fall (vgl. Abb. 23).

Dies bestätigt die Annahme, dass vor der Separation zwei Populationen vorlagen: eine mit sehr hoher Expression an Intrabody-Molekülen, die auch durch Interferon- -Stimulation zusätzliche RT1.A-Moleküle intrazellulär zurückhalten können und eine andere Population, deren Intrabody-Produktion zwar für die intrazelluläre Bindung von konstitutiv-exprimierten RT1.A-Molekülen ausreicht, jedoch nicht für deren durch Interferon- erhöhte Anzahl.

Es wird an dieser Stelle erwähnt, dass durch die hohe Zelldichte nach der Selektion der transfizierten Zellen in Selektionsmedium durchaus die Möglichkeit bestand, Mehrfachklone statt Einzelklone zu isolieren. Durch die Stimulation mit Interferon- und die anschließende Selektion durch Magnetpartikel konnten diese Mehrfachklone vereinzelt werden.

**In Keratinozyten mit ungenügender Intrabody-Expression kann Interferon-
den "downregulatorischen" Effekt der Intrabodies aufheben**

γ

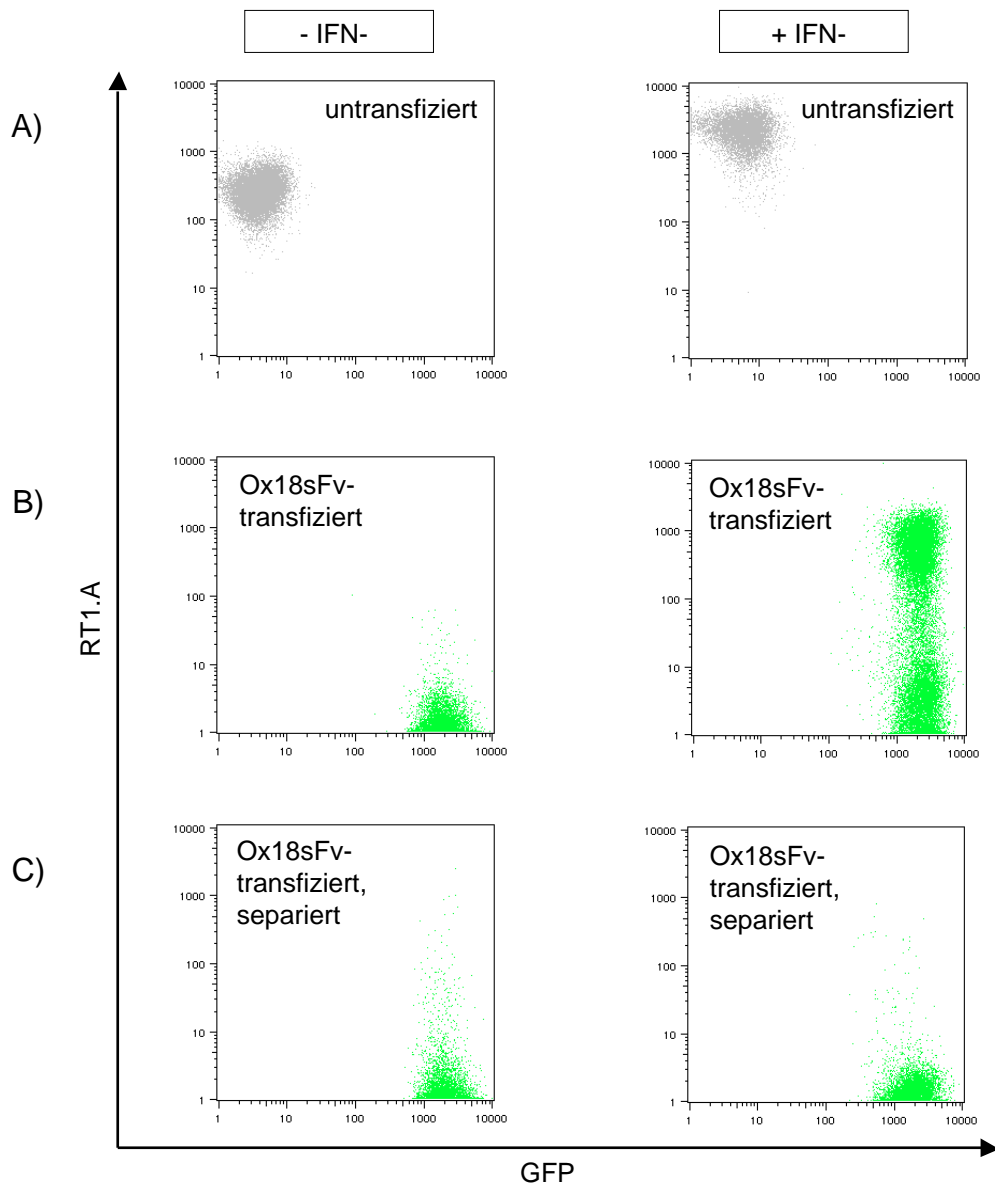


Abb. 23: Rattenkeratinozyten wurden mit 10 ng/ml IFN- für 48h stimuliert, und auf ihre RT1.A- (Ratten-MHC-I) Oberflächenexpression untersucht.

- A) Die RT1.A-Expression in untransfizierte Rattenkeratinozyten wird durch IFN- gesteigert.
- B) Der stabil-Ox18sFv-transfizierte Keratinozytenklon teilt sich nach IFN- -Stimulation in zwei Populationen: die eine zeigt eine verstärkte RT1.A-Oberflächenexpression, die andere behält den RT1.A-"downregulierten" Phänotyp.
- C) links: Die RT1.A-negativen Zellen des IFN- -stimulierten Ox18sFv-transfiziertem Klon werden von den RT1.A-positiven Zellen mittels Magnetpartikelseparation getrennt und weiter kultiviert.
- rechts: Diese separierten Zellen können 48h nach IFN- -Stimulation keine RT1.A-Moleküle mehr an der Zelloberfläche exprimieren.

4.6 Funktionelle Bedeutung der MHC-I-"downregulatorischen" Proteine

Am Ende aller bisher gezeigten molekularbiologischer Resultate und *in vitro* erhaltener Ergebnisse steht die Frage: wie wirkt sich der MHC-I-"knock-out"-Phänotyp der Zellen funktionell auf die Immunogenität der Zellen aus? Es wurde untersucht, ob Intrabody-exprimierende Rattenkeratinozyten von zytotoxischen Zellen *in vitro* erkannt und lysiert werden können.

4.6.1 Zytotoxizitäts-Test mit Intrabody-exprimierenden Rattenkeratinozyten als Targetzellen

Für den Zytotoxizitäts-Test wurden allogene Ratten-Milzzellen durch eine 4-tägige Kokultur mit alloenen, d.h. dem Haplotyp der Keratinozyten entsprechenden, Milzzellen vorstimuliert. Stimulator- bzw. Targetzellen stammten in diesem Fall Zellen von DA-Ratten, Responderzellen von Lewis-Ratten. Nach der Vorstimulation der Responderzellen wurden diese in verschiedenen Ratios mit den mit Europium markierten Rattenkeratinozyten für zwei Stunden inkubiert und das freigesetzte Europium im Überstand fluorimetrisch bestimmt. Zur besseren Übersicht sind die relevanten Zellen des Testsystems noch einmal dargestellt:

| <u>Zellen</u> | <u>Stamm</u> | <u>Haplotyp</u> | <u>Rolle im Zytotoxizitäts-Test</u> |
|---------------------------|----------------|------------------|-------------------------------------|
| CD8 ⁺ T-Zellen | Lewis | RT1 ^l | Effektorzellen |
| APZ | DA | RT1av1* | Stimulatorzellen |
| Keratinozyten | DA | RT1av1* | Targetzellen |
| NRK-52E Zelllinie | Osborne-Mendel | RT1uv3** | Targetzellen (Kontrolle) |

* RT1av1 = RT1.A^a B/D^a C^{av1}

** RT1uv3 = RT1.A^u B/D^u C^{uv3}

4.6.1.1 Optimierung der Europium-Konzentration

Zunächst musste die Konzentration an Europium ermittelt werden bei der die Zellen am meisten Moleküle aufnehmen und dabei eine geringe spontane Freisetzung haben. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit Markierungspuffer verschiedener Europium-Konzentrationen inkubiert. Anschließend wurden Verdünnungsreihen dieser Zellen in 96-Well Platten pipettiert und 2h mit (maximale Freisetzung) oder ohne (spontane Freisetzung) Triton-X 100 inkubiert. Die so ermittelten Werte für die maximale bzw. spontane Freisetzung sind in Abb. 24 grafisch aufgetragen. Es wurde eine Europium-Konzentration von 800 μM für alle nachfolgenden Markierungen gewählt, bei der die Differenz zwischen maximaler und spontaner Freisetzung für die eingesetzte Zellzahl von 10.000 Targetzellen am höchsten war. Außerdem zeigt die Kurve für die maximale Freisetzung einen linearen Verlauf, d.h. die Messwerte für die freigesetzten Europium-Moleküle korrelieren mit der Anzahl an lysierten Zellen.

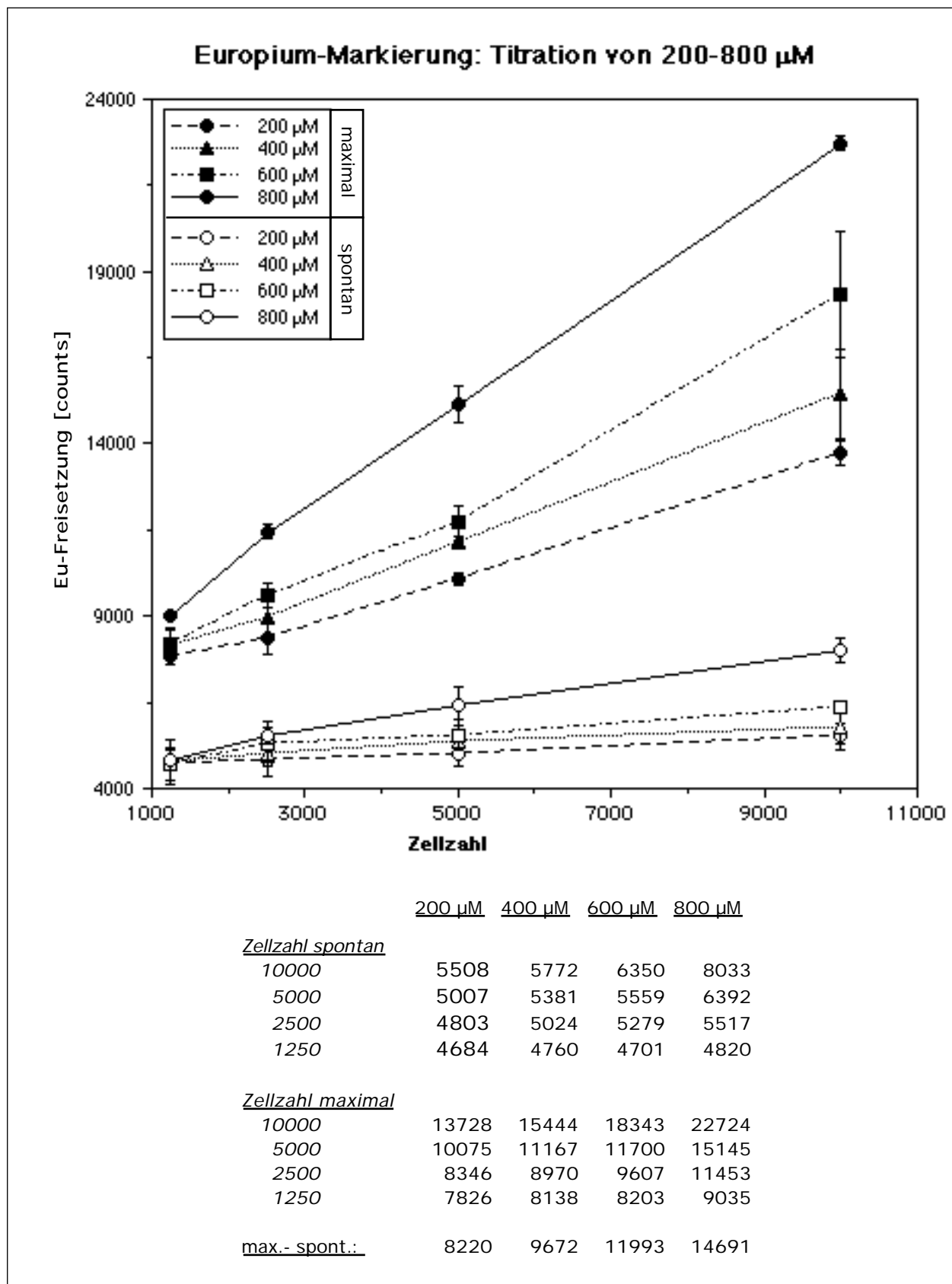


Abb. 24: Markierung von Rattenkeratinozyten mit unterschiedlichen Europium-Konzentrationen. Ermittlung der optimalen Konzentration bei 10000 Zellen durch:

$$\text{maximale Freisetzung} - \text{spontane Freisetzung} = \text{max}$$

4.6.1.2 Zytotoxizitäts-Test

Abb. 25 zeigt die Ergebnisse sämtlicher durchgeführter Zytotoxizitäts-Tests. Zur besseren Übersicht wurden nur Kontrollintrabody-transfizierte (8KsFv), anti-Ratten-MHC-I- (RT1.A) Intrabody-transfizierte (Ox18sFv) und "third-party"-Zellen (NRK-52E, Rattenepithelzellen mit differentem MHC-I-Haplotyp, gegen welche die Effektorzellen nicht vorstimuliert wurden) dargestellt. Die Werte der (nicht aufgeführten) untransfizierten Keratinozyten waren weitestgehend mit denen der Kontrollintrabody-transfizierten Zellen identisch.

Alle Experimente zeigen eine deutlich geringere zytolytische Aktivität der zytotoxischen T-Zellen (Effektorzellen) gegenüber anti-RT1.A-Intrabody-transfizierten Rattenkeratinozyten - im Gegensatz zu Kontrollintrabody-transfizierten oder "third-party"-Zellen.

Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz wurden die Werte der Paare 8KsFv/Ox18sFv bzw. 8KsFv/NRK für eine bestimmte Effektor-zu-Target Ratio einem Wilcoxon-Test unterworfen. Die Ergebnisse aller Wertepaare (Effektor-zu-Target-Ratio = 120:1 bis 3:1) zeigten, dass diese geringere spezifische Lyse der anti-RT1.A-Intrabody-transfizierten Keratinozyten signifikant war ($p = 0,0051 - 0,0022$ für den Vergleich mit Kontrollplasmid transfizierten Keratinozyten; $p = 0,0051 - 0,0277$ für den Vergleich mit "third-party"-Zellen).

Abb. 25 (nächste Seite): Zytotoxizitäts-Test. Inkubiert wurden 1×10^4 Targetzellen mit der entsprechenden Ratio an Effektorzellen. Gezeigt sind zehn verschiedene Experimente. Deutlich wird, dass anti-Ratten-MHC-I-Intrabody-transfizierte Rattenkeratinozyten (offene Kreise) wesentlich weniger lysiert werden als Kontrollintrabody-infizierte (geschlossene Kreise) oder "third-party"-Zellen (Dreiecke).

Targetzellen:

anti-Ratten-MHC-I-Intrabody- (Ox18sFv) transfizierte DA-Rattenkeratinozyten

Kontrollintrabody (anti-human-MHC-I-Intrabody, 8KsFv) transfizierte DA-Rattenkeratinozyten

Zellen mit differenten MHC-I-Haplotyp ("third-party", NRK-52E)

Effektorzellen:

allogen (mit DA-Rattenmilzzellen) vorstimulierte Lewis-Rattenmilzzellen

**Intrabody-exprimierende Rattenkeratinozyten
sind wenig sensitiv gegenüber der zytolytischen
Aktivität zytotoxischer T-Zellen**

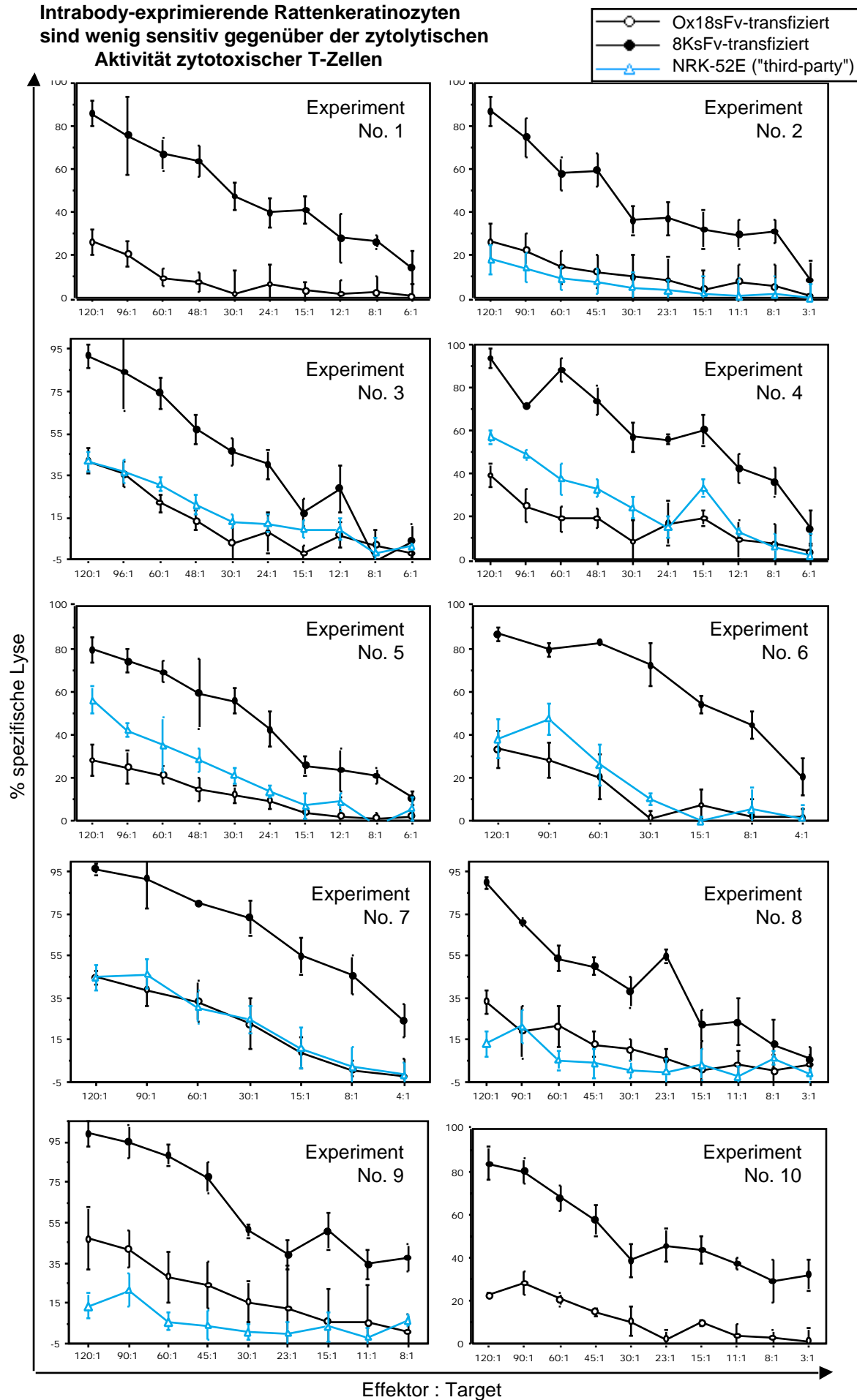


Abb 25

4.6.2 Transplantation von gezüchteten Rattenhautstücken

Die Transplantation von gezüchteten Rattenhautstücken wird derzeit noch etabliert. Bei der Transplantation von *in vitro*-generierten Hautschichten ohne ein unterstützendes Trägermaterial (vgl. Abschnitt 3.6.1) konnten aus technischer Sicht keine befriedigenden Ergebnisse erzielt werden. Hierbei wurden auf vasilinisiertes Gasegewebe aufgezoogene Rattenkeratinozytenschichten auf den dorsalen Muskel von Lewis-Ratten transplantiert. Auch die Transplantation von auf Hyaloronsäuremembranen ausgesäten Keratinozyten verlief unbefriedigend.

Die sehr dünnen Hautschichten zeigten eine hohe Scherkraftempfindlichkeit, so dass schon das Aufziehen der kultivierten Keratinozytenschichten auf vasilinisiertes Gasegewebe zur Transplantation problematisch war. Die Ablösung der Gase, auf welche die Keratinozytenschichten zur Transplantation aufgezoogen worden waren, gestaltete sich schwierig, da sie zum Teil in die Haut des Tieres eingewachsen war, was eine Zerstörung von potentiell gewachsenem Gewebe möglich machte. Zum Teil entwickelten sich bei den Tieren Infektionen im Transplantatareal, so dass auch hier eine Auswertung unmöglich war. Die histologischen Befunde ergaben, dass bei syngener Transplantation kein epitheliales Gewebe auf dem Muskel gewachsen war. Zudem kam es zur Entwicklung von Granulationsgewebe mit vielen Gefäßen und starker Fibroblastenproliferation - zum Teil auch zur Bildung von Ödemen und Abzessen.

Bei der Verwendung von Hyaloronsäuremembranen zur Generierung der Hautstücke wurden ähnlich schlechte Ergebnisse erzielt, wie ohne unterstützendes Trägermaterial. Histologische Befunde ergaben das Vorhandensein von viel Granulations- und Bindegewebe, keine Existenz Zytokeratin-positiver Zellen und eine starke Proliferation von Fibroblasten.

Zur Zeit werden alternative Methoden für die Transplantation getestet, wie die Aussaat von Keratinozyten auf Hyaloronsäuremembranen oder Kollagengelen, die Verwendung eines Fibrinklebers und das Aufbringen von Keratinozyten auf dermisähnliche Trägermaterialien.

5 Diskussion

Die Hauptursache für die immunologische Erkennung und die Rejektion allogener Transplantate ist die Expression von Haupthistokompatibilitätsantigenen auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals versucht, die Oberflächenexpression von MHC I durch den Einsatz von Intrabodies zu inhibieren. Bisher wurde dieses Ziel durch die Eliminierung von Genen, deren Produkte zur vollständigen Assemblierung des MHC-I-Komplexes benötigt werden, im Tiermodell verfolgt. Im Gegensatz zu Zellen aus TAP- oder α_2 -Mikroglobulin-knock-out Mäusen, die eine Restexpression an MHC-I-Molekülen aufweisen, konnte durch den Einsatz von anti-MHC-I-Intrabodies ein vollständiger "knock-out"-Phänotyp in Ratten- und humanen Zellen erzielt werden, der auch durch Interferon- nicht aufgehoben werden konnte. Die Effektivität der Intrabodies bezüglich ihrer Fähigkeit, die MHC-I-Oberflächenexpression zu senken, wurde durch Vergleich mit einem anderen MHC-I-"downregulatorischen" Molekül, dem adenoviralen Protein p19, das ebenfalls die MHC-I-Expression durch Bindung verhindert, in humanen 293-Zellen untersucht. Dieser qualitative Vergleich ergab, dass der in dieser Arbeit eingesetzte anti-human-MHC-I-Intrabody wesentlich effektiver eine Reduktion der MHC-I-Expression auf der Zelloberfläche bewirken konnte als p19. Darüber hinaus war die Lyse Intrabody-exprimierender, MHC-I-defizienter Rattenkeratinozyten durch zytotoxische T-Zellen *in vitro* signifikant schwächer als die untransfizierter Zellen. Der Einsatz anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Keratinozyten im Tissue Engineering und die Transplantation MHC-I-defizienter gezüchteter Hautstücke könnte zu einer verbesserten Akzeptanz des Transplantats führen und eröffnet neue Möglichkeiten, den Bedarf an menschlicher allogener Haut für die Transplantation zu decken. Außerdem könnten diese genetisch manipulierten Hautstücke auf "Vorrat" produziert werden, was die Einsatzzeit dramatisch verkürzen würde. Darüber hinaus wäre dieses Prinzip übertragbar auf andere Zell- bzw. Gewebetransplantate.

5.1 Ein anti-Ratten-MHC-I-Intrabody als Fab-Fragment: Ox18Fab

5.1.1 Synthese und Proteinnachweis

Nach Klonierung der Genfragmente für die Ketten VLCL und VHCH1 des OX-18-Antikörpers in einen Expressionsvektor wurden diese zunächst auf einige Charakteristika untersucht, um sicherzustellen, dass für alle weiteren Experimente funktionelle Produkte eingesetzt wurden.

Zuerst wurde durch *in vitro*-Translation gezeigt, dass Fragmente mit korrekter Länge kloniert wurden. Nach Bestimmung der Sequenz konnten die Antikörperfragmente nach dem Kabat/Chothia-Nummerierungs-Schema in CDR- und Framework-Bereiche eingeteilt werden. Ferner wurden durch den Vergleich der Proteinsequenzen mit denen anderer Proteinen der NCBI-Datenbank ausschließlich Homologien mit Immunoglobulinsequenzen ermittelt, wodurch der Nachweis erbracht wurde, dass tatsächlich funktionelle Antikörperfragmente kloniert wurden.

Durch die Expression des Ox18Fab-Intrabodies in COS-Zellen konnte zum einen bewiesen werden, dass die Stabilität der mRNAs beider Ketten in eukaryotischen Zellen gewährleistet war, zum anderen, dass beide Ketten in gleicher Quantität exprimiert wurden.

5.1.1.1 ER-Retention der Intrabodies: mit oder ohne KDEL?

Das in vielen ER-residenten Proteinen zu findende carboxy-terminale Tetrapeptid KDEL, ist notwendig und ausreichend für die Lokalisation und Retention von Proteinen im Lumen des Endoplasmatischen Retikulums [187,188]. Der Rezeptor für die KDEL-Sequenz, erd 2, ist im cis-Golgi lokalisiert [189] und bindet dort das KDEL-enthaltende Protein bei einem pH-Optimum von 5,0 [190]. Da der pH-Wert vom ER in Richtung des trans-Golgi-Netzwerkes sinkt, kann hier erd 2 seinen Liganden mit hoher Affinität binden. Durch die Bindung an erd 2 wird dem Rezeptor signalisiert, das Protein zurück ins ER zu transportieren, wo es aufgrund des neutraleren pH Wertes wieder freigelassen wird und erd 2 wieder an seine Ursprungsstelle zurückkehren kann, wo es für die Bindung neuer Liganden zur Verfügung steht.

Der Ox18Fab-Intrabody wurde sowohl mit als auch ohne KDEL-Retentionssequenz kloniert, da zum Teil auch Intrabodies ohne diese Retentionssequenz im ER zurückgehalten wurden und in einigen Fällen Intrabodies durch die Addition der KDEL-Sequenz im ER degradiert wurden [54]. Für die meisten Fälle ist jedoch die Addition der KDEL-Sequenz das geeignete Mittel, funktionelle Antikörper im ER zurückzuhalten, wo sie an ihr frisch synthetisiertes Antigen binden können. Um die erwähnten, eventuell deletiösen Effekte durch das KDEL-Signal einkalkulieren zu können, wurden beide Varianten des Intrabodies synthetisiert. Bei der Expression in Cos Zellen zeigte sich jedoch, dass beide Varianten in gleich großer Quantität vorlagen, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass dies auch in anderen Zellen der Fall ist.

5.1.2 Expression von Ox18Fab in der epithelialen Rattenzelllinie NBT-II

Es konnte kein signifikanter Effekt des Ox18Fab- bzw. Ox18FabKDEL-Intrabodies auf die RT1.A-Expression von NBT-II-Zellen festgestellt werden. Da Intrabodies als "single chain"-Fragmente oft eine höhere Stabilität besitzen als Fab-Fragmente [72, 73], wurde der Ox18-Intrabody dann als sFv-Fragment kloniert. Des Weiteren wurde ein vom amerikanischen Kooperationspartner parallel hergestellter sFv-Intrabody gegen das humane MHC-I-Molekül getestet.

5.2 Intrabodies als "single chain"-Fragmente: 8KsFv und Ox18sFv

Schon bei transienter Expression des anti-human-MHC-I-Intrabodies 8KsFv in 293-Zellen konnte eine deutliche Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression detektiert werden. Es konnten weiterhin stabil-Intrabody-exprimierende Einzelklone mit einer starken "Downregulation" der MHC-I-Oberflächenexpression generiert werden. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden primäre humane Keratinozyten durch adenoviralen Gentransfer mit dem 8KsFv-Intrabody transduziert. Auch hier konnte im Gegensatz zu uninfizierten oder mit Kontrollkonstrukt transduzierten Keratinozyten eine starke Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression erreicht werden.

Die positiven Ergebnisse bei dem Einsatz des 8K-"single chain"-Intrabodies konnten jedoch nicht für den Ox18sFv-Intrabody reproduziert werden. Die generierten NBT-II-Klone zeigten keine signifikante Änderung ihrer RT1.A-Oberflächenexpression gegenüber untransfizierten Zellen. Es lag die Vermutung nahe, dass eine unzureichende Intrabody-Expression der Zellen die Ursache für das Ausbleiben des phänotypischen Effekts war. Daher wurden einige der Klone mittels Immunopräzipitation auf das Vorhandensein von Intrabody-Proteinen untersucht: es konnten auf Proteinebene keine Intrabody-Expression in den Zellen nachgewiesen werden. Da diese Analytik für alle Klone zu aufwendig gewesen wäre, wurde eine neue Strategie entwickelt, Intrabody-exprimierende Zellen zu detektieren.

5.3 Intrabody-GFP-Fusionsproteine: Ox18sFvGFP, 8KsFvGFP

Eine gute Möglichkeit zur Detektion exprimierter Proteine ist ihre Fusion mit dem "green fluorescent protein" GFP. Dabei ist nicht immer gewährleistet, ob die fusionierten Proteine ihre Funktion beibehalten. Durch die Fusion können wichtige Domänen umgefaltet oder sterisch behindert werden, so dass die ursprüngliche Funktion des Proteins verloren geht. Bei Intrabodies war dies nicht zu erwarten, da das GFP am C-Terminus fusioniert wird und die Antigen-Bindungsstelle am N-Terminus der beiden Ketten lokalisiert ist. Durch die Fusion der Intrabodies mit dem GFP-Molekül war erstmals eine Korrelation zwischen Intrabody-

Expression und MHC-I-Oberflächenexpression möglich. Transient-Intrabody-exprimierende Rattenkeratinozyten sowie 293-Zellen zeigten bei Transfektion mit dem spezifischen anti-MHC-I-Intrabody eine deutliche Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression - im Gegensatz zu Kontrollintrabody-transfizierten oder uninfizierten Zellen.

Die Fusion des Intrabodies mit dem GFP-Molekül resultierte außerdem in einer besseren Effektivität der MHC-I-"Downregulation" als ein parallel untersuchtes Ox18sFv-Intrabody-Konstrukt in einem bicistronischer Vektor mit GFP in der zweiten Kassette. Der Grund hierfür könnte in der Größe des Fusionsmoleküls liegen, wodurch es besser im ER zurückgehalten wird oder eine längere Halbwertszeit besitzt. Möglich wäre auch, dass die Addition der KDEL-Sequenz an den C-Terminus des GFP eine bessere Bindung des erb-2-Rezeptors an das Fusionsmolekül ermöglicht als die Addition der Sequenz an das Intrabody-Molekül. Mögliche sterische Vorteile könnten bei der Bindung eine Rolle spielen. Als Resultat würde das Fusionsmolekül effektiver im ER zurückgehalten werden.

An dieser Stelle ist anzumerken, dass davon ausgegangen werden kann, dass die exprimierten Intrabodies nicht zusammen mit RT1.A-Molekülen an die Zelloberfläche transportiert werden und die Bindung des für die RT1.A-Oberflächenmarkierung eingesetzten F16-Antikörpers sterisch behindern (was zu falschen Ergebnissen führen würde), da intrazellulär eine erhöhte Anzahl an RT1.A-Molekülen in Intrabody-exprimierenden Zellen detektierbar war (vgl. Abschnitt 5.4.2) - hier also keine Blockierung der Bindung von anti-RT1.A-Antikörpern durch die (in großer Menge vorhandenen) Intrabodies zu verzeichnen war.

5.3.1 Eine hohe Quantität an anti-MHC-I-Intrabodies ist essentiell für eine effektive Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression

Ein wichtiger Faktor für eine effektive RT1.A-"Downregulation" ist eine ausreichende Quantität an Intrabody-Molekülen. Erst bei einer bestimmten Menge an intrazellulär produzierten Intrabody-Molekülen wurde eine Reduktion der RT1.A-Oberflächenexpression erreicht. Es müssen alle schweren Ketten des RT1.A-Moleküls intrazellulär durch Intrabodies gebunden werden. Möglich ist außerdem eine geringere Halbwertszeit des Intrabodies als die des RT1.A-Moleküls mit einer Überproduktion an Intrabodies kompensiert werden muss. Jeder (transient) RT1.A-bindende Intrabody würde in diesem Fall durch einen zweiten, neu synthetisierten Intrabody ersetzt werden, welcher die weitere Retention des RT1.A-Moleküls gewährleistet. Um hier jedoch eine definitive Aussage treffen zu können, müsste die

Halbwertszeit des Ox18-Intrabodies mit der des RT1.A-Moleküls verglichen werden. Hierfür müssten z.B. "pulse chase"-Assays durchgeführt werden, bei denen in der Zelle der Einbau radioaktiver Aminosäuren in das Protein erfolgt und die Präsenz der so markierten Proteine über einen bestimmten Zeitraum untersucht wird.

5.3.2 Anti-human-MHC-I-Intrabodies sind effektiver in der Reduktion der MHC-I-Oberflächenexpression als das adenovirale Protein p19

Ein interessanter Aspekt im Rahmen dieser Arbeit war es, zwei hochdifferenzierte Moleküle bezüglich der Fähigkeit, eine MHC-I-"Downregulation" auf der Zelloberfläche zu erzielen, miteinander zu vergleichen: das adenovirale Protein p19, das von dem Virus synthetisiert wird, um eine Präsentation viraler Proteine durch die Wirtszelle zu vermeiden und so der Immunantwort zu entkommen - und das (intrazellulär lokalisierte) monoklonale Antikörperfragment, das sein Antigen, das MHC-I-Molekül, mit einer sehr hohen Spezifität bindet.

Beim Vergleich des anti-human-MHC-I-Intrabodies 8KsFvGFP mit dem adenoviralen Protein p19 bezüglich der Fähigkeit, eine MHC-I-"Downregulation" in 293-Zellen zu erzielen, zeigte sich der Intrabody als das wesentlich effektivere Molekül. Erklärbar wäre dieses Phänomen mit einer geringeren Affinität von p19 zum MHC-I-Molekül. Es ist bekannt, dass p19 eine unterschiedliche Affinität zu verschiedenen HLA-Haplotypen aufweist: so bindet es mit hoher Affinität an HLA-A2.1 und -B7, jedoch weniger stark an HLA-A3 [191]. Die 293-Zelllinie besitzt den Haplotyp HLA-A3/HLA-B7. Die verminderte Bindung an HLA-A3 könnte für die geringere "Downregulation" der MHC-I-Gesamt-Oberflächenexpression auf 293-Zellen verantwortlich sein. Die zusätzliche Funktion von p19 als Tapasin-Kompetitor scheint in diesem Fall nicht auszureichen, um die schwächere Affinität zum MHC-I-Molekül zu kompensieren. Des Weiteren könnte die geringere Affinität des p19-Proteins gegenüber dem MHC-Molekül in seiner Funktion für das Adenovirus begründet sein: da die Verbreitung des Virus in der Regel über periphere Blutzellen erfolgt, die bei vollständiger MHC-I-Defizienz ein potentiell Ziel für NK-Zellen darstellen würden, könnte es für die Propagierung des Virus besser sein, nur eine verminderte MHC-I-Oberflächenexpression zu erzielen. Möglich ist jedoch auch, dass im Virusgenom weitere Proteine kodiert werden, die synergistisch mit p19 wirken. Dieses aufzuklären war jedoch nicht Ziel dieser Arbeit.

Es kann ausgeschlossen werden, dass der Grund für die unterschiedliche Retentionsfähigkeit in den unterschiedlichen Retentionssequenzen (KDEL vs. K(X)KXX) der beiden Moleküle

liegt, da beide als GFP-Fusionsmoleküle eingesetzt wurden und somit beide das carboxyterminale Ende "-GFPKDEL" enthielten.

Die Verwendung von Intrabodies ist die bessere Lösung, um eine effektive "Downregulation" der MHC-I-Oberflächenexpression zu erzielen, da hier eine gleich starke Bindung an alle MHC-I-Haplotypen gewährleistet ist und sie - im Gegensatz zu MHC-I-bindenden viralen Proteinen - universell einsetzbar sind.

Um die Effizienz der MHC-I-"Downregulation" noch weiter zu steigern, wäre eine Kombination von viralen Proteinen wie US2 oder US11 und anti-MHC-I-Intrabodies denkbar. Bei Zellen beispielsweise, die keine so hohe Intrabody-Expression tolerieren, wie die in dieser Arbeit verwendeten Rattenkeratinozyten, könnte dieser Ansatz von Bedeutung sein. Durch den durch die viralen Proteine vermittelten Export an MHC-I-Molekülen aus dem ER und die nachfolgende Proteolyse wären weniger Intrabodies erforderlich, um die verbleibenden MHC-I-Moleküle zu binden. Außerdem könnte dieser Kombinationsansatz eine geringere Belastung der Zelle zur Folge haben, da weniger MHC-I-Moleküle intrazellulär akkumuliert vorliegen würden.

5.4 Charakterisierung anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass die anti-MHC-I-Intrabody-exprimierenden Zellen sich morphologisch und physiologisch nicht von untransfizierten Zellen unterscheiden. Diese Erkenntnis ist für den Nachweis der ausschließlichen Spezifität der Intrabodies für ihre Antigene als auch für den weiteren Einsatz der Zellen *in vivo* von Bedeutung.

5.4.1 Andere Oberflächenmoleküle werden durch die Expression von Intrabodies nicht beeinträchtigt

Die Untersuchung der konstitutiv exprimierten Antigene CD46, CD49b, CD49d CD55 sowie CD58 als auch der regulierbaren bzw. induzierbaren Antigene RT1.B und ICAM-1 ergab keine signifikant differente Expression auf Intrabody-exprimierenden Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen. Außerdem waren sowohl Intrabody-transfizierte als auch uninfizierte Zellen durch Interferon- aktivierbar, was sich vor allem in der Induktion von RT1.B (Ratten-MHC-Klasse-II) widerspiegelte.

5.4.2 Akkumulation von MHC-I-Molekülen in Intrabody-exprimierenden Zellen

Es wurde eine deutlich erhöhte Anzahl an MHC-I-Molekülen in Intrabody-exprimierenden Keratinozyten und 293-Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen nachgewiesen. Die Stärke der MHC-I-Akkumulation ist Zelltyp-abhängig. In den im Rahmen der Arbeit untersuchten Zellen war ein beträchtliches Ausmaß an akkumulierten Molekülen erkennbar, in Experimenten anderer Mitarbeiter, z.B. bei adenoviralem Gentransfer von Intrabodies in HaCat Zellen, war keine so hohe Akkumulation detektierbar. Wie der finale proteolytische Abbau der MHC-I-Moleküle in der Zelle erfolgt, ist unklar.

5.4.3 In stark Intrabody-exprimierenden Zellen kann der MHC-I-"knock-out"-Phänotyp nicht durch Interferon- aufgehoben werden

Da bei Hauttransplantationen oft ein Entzündungsmilieu vorherrscht, wurde diese Entzündungsreaktion *in vitro* durch Zugabe des proinflammatorischen Zytokins Interferon- , das die MHC-I-Expression auf Zellen heraufreguliert, simuliert und die MHC-I-Expression Intrabody-exprimierender Zellen analysiert. Bei dieser Untersuchung wurde noch einmal deutlich, dass eine sehr starke Expression von anti-MHC-I-Intrabodies benötigt wird, um alle MHC-I-Moleküle intrazellulär zurückzuhalten - es ist jedoch möglich, diese Expressionsraten zu erreichen.

5.5 Immunogenität anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Zellen *in vitro*

5.5.1 Geringere lytische Aktivität zytotoxischer T-Zellen gegenüber Intrabody-exprimierenden Zellen

Ein wichtiger Beweis für die funktionelle Bedeutung der MHC-I-"Downregulation" durch Intrabodies war die stark verminderte zytolytische Aktivität zytotoxischer T-Zellen gegenüber Intrabody-exprimierenden Rattenkeratinozyten: diese Zellen mit einem RT1.A-"knock-out"-Phänotyp sind *in vitro* weitaus weniger immunogen als unmodifizierte Keratinozyten. Dieses Ergebnis lässt auf eine ebenfalls geringere Immunogenität eines Hauttransplantats mit verbesserter Akzeptanz *in vivo* hoffen.

5.6 Immunogenität anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Zellen *in vivo*

5.6.1 Das "NK-Zell-Problem"

NK- (natural killer) Zellen sind große granuläre Lymphozyten, die die Fähigkeit besitzen, Tumore, virus-infizierte Zellen und allogene Lymphoblasten zu erkennen und zu töten. Hierzu bedarf es keines vorherigen Kontakts mit dem Antigen: NK-Zellen leisten damit einen wichtigen Beitrag zur angeborenen Immunität. Ein Hauptmerkmal der NK-Zell-Aktivität ist ihre Inhibierung durch MHC-I-Moleküle, die auf der Oberfläche ihrer Zielzellen exprimiert werden. Durch diesen Mechanismus kann das Immunsystem Zellen eliminieren, die durch Virus-Infektion oder Transformation eine verminderte MHC-I-Oberflächenexpression aufweisen.

NK-Zellen und einige T-Zellpopulationen erkennen MHC-I-Moleküle spezifisch durch die inhibitorische Rezeptorfamilie der KIRs ("killer immunoglobulin-like receptors"), die Familie der ILTs ("immunoglobulin-like transcripts") und dem Rezeptorkomplex CD94–NKG2 [192].

Die Familie der KIRs ist strukturell in zwei Unterfamilien eingeteilt: einige KIRs haben zwei Immunoglobulin-Domänen (KIR2D), andere drei (KIR3D). KIRs variieren außerdem in der Länge ihrer zytoplasmatischen Domäne: KIRs mit einer langen zytoplasmatischen Domäne (L = "long") vermitteln ein inhibitorisches Signal, KIRs mit einer kurzen Domäne (S = "short") bewirken eine Aktivierung der NK-Zell- (oder T-Zell-) Antwort [193]. So werden den Mitgliedern der KIR-Familie z.B. die Namen KIR3DL oder KIR2DS zugeordnet. Das inhibitorische Signal wird durch sogenannte ITIMs ("immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs") innerhalb des zytoplasmatischen Teils vermittelt, die die Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 rekrutieren, welche potentiell an der Inhibierung der NK-Zellfunktion beteiligt sind [194]. Das aktivierende Signal der Rezeptoren KIR2DS/KIR3DS wird durch die Bindung von DAP12-Dimeren eingeleitet [195]. Diese ITAM- (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) enthaltenden Proteine rekrutieren ihrerseits die Tyrosinkinasen ZAP70 und syk, was in einer finalen Aktivierung der Zelle resultiert. Jeder KIR-Rezeptor erkennt eine Reihe von klassischen MHC-I-Alloantigenen.

Auch die Familie der ILTs unterteilt sich in ITIM-enthaltende und ITIM-negative Moleküle. Die ersteren vermitteln (möglicherweise auch über SHP-1) bei Bindung von MHC-I-Molekülen wie KIR2DL/KIR3DL ein inhibitorisches Signal, das zur Herabregulierung der zytotoxischen Aktivität in T- und NK-Zellen führt [196]. Die Erkennung von MHC-I-Molekülen durch inhibitorische Rezeptoren scheint also einen generellen immunoregulatorischen Mechanismus darzustellen.

Der spezifische Ligand für die lektin-ähnlichen CD94–NKG2-Rezeptoren ist das nicht-klassische MHC-I-Molekül HLA-E [197-199]. HLA-E wird durch einen TAP-abhängigen Mechanismus zusammen mit Peptiden aus Signalsequenzen anderer MHC-I-Alloantigene assembliert [200, 201]. Daher wird angenommen, dass durch die Detektion von HLA-E die generelle Biosynthese an MHC-I-Molekülen überwacht werden kann. Auch die CD94–NKG2-Rezeptoren können ein inhibitorisches oder ein aktivierendes Signal vermitteln: der Komplex CD94–NKG2A bildet einen inhibitorischen Rezeptor, der durch die ITIM-enhaltene NKG2A-Untereinheit SHP-Tyrosinphosphatasen rekrutiert [202] - dagegen bildet CD94 durch Assoziation mit dem NKG2C-Protein einen aktivierenden Rezeptor, der an DAP12 bindet [203].

Über die aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden ist noch wenig bekannt. Neben den schon erwähnten Rezeptoren scheint die lektin-ähnliche NKR-P1-Familie mit der Spezifität für bestimmte Oligosaccharide auf der Zelloberfläche ein aktivierendes Signal zu vermitteln [204, 205]. Es wird spekuliert, ob transformierte Zellen wie z.B. Tumorzellen durch den NKR-P1-Rezeptor erkannt werden. Weitere aktivierende Rezeptoren sind NKp46, NKp44 und NKp30 [206-210]. Es sind wahrscheinlich noch viele weitere Rezeptoren in der Aktivierung von NK-Zellen involviert; ebenso sind vermutlich auch noch nicht alle inhibitorischen Rezeptoren bekannt.

Ob NK-Zellen bei der Erkennung MHC-I-defizienter Organe eine Rolle spielen wurde bis jetzt nicht beschrieben. Sie sind jedoch in der Lage, syngene MHC-I-defiziente Lymphoblasten und Knochenmarkzellen von β_2 -Mikroglobulin- oder TAP-knock-out Spendern zu lysieren [211-213]. Die Transfektion dieser NK-Zell-sensitiven Zellen mit HLA-A- oder -B-Molekülen resultierte in einer Resistenz der Zellen gegenüber der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität [214, 215]. Die Transplantation allogener Hauttransplantate β_2 -Mikroglobulin-defizienter Mäuse führte hingegen zu keiner NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität in Wildtyp-Empfängern [49]. Diese Nicht-Reaktivität könnte damit erklärt werden, dass Zellen in Organverband - im Gegensatz zu hämatopoetischen Einzelzellen - keine NK-Zell-aktivierenden Signale vermitteln, sei es durch das Fehlen entsprechender Oberflächenproteine oder durch das sie umgebende Milieu.

Sollten NK-Zellen bei der Rejektion anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Hauttransplantate dennoch eine Rolle spielen, wäre die zusätzliche Transfektion der Keratinozyten mit NK-Zell-inhibitorischen Molekülen, wie dem nicht-klassischen MHC-I-Molekül HLA-G, ein Lösungsansatz. HLA-G wird auf Plazentazellen, die vom Fetus stammen und in die Gebärmutterwand einwandern, exprimiert [216-218]. Die Kombination aus dem Fehlen klassischer MHC-I-Moleküle und der Expression von HLA-G schützt möglicherweise den Fetus vor einem Angriff durch zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen. Ferner ist es auf der

Oberfläche einiger Melanomzellen exprimiert, was - durch den Schutz vor NK-Zellen - eine Tumorprogression begünstigen würde [219]. Des Weiteren konnte die MHC-I-negative, NK-Zell-sensitive Zelllinie 721.221 durch die Transfektion mit HLA-G vor der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität geschützt werden [220].

Die Rezeptoren für HLA-G sind teilweise aufgeklärt. Ob KIRs eine Rolle spielen ist unklar - es wird vermutet, dass der KIR2DL4-Rezeptor eine Rolle spielt [221]. Ein spezifischer Ligand für das HLA-G-Molekül ist eindeutig der ILT2-Rezeptor, der neben HLA-G ein breites Spektrum an MHC-I-Molekülen erkennt [196]. Eine weitere Interaktion der NK-Zelle mit dem HLA-G-Molekül findet durch den CD94-NKG2-Komplex statt: HLA-G enthält in der Leadersequenz ein Nonamer-Peptid, das HLA-E stark stabilisiert (und so in einer verstärkten Oberflächenexpression resultiert) und durch den CD94-NKG2-Komplex erkannt werden kann [199]. Ein solches Signalpeptid ist ebenfalls in dem kürzlich entdeckten UL40-Protein des Zytomegalievirus enthalten und führt auch hier zur Stabilisierung und verstärkten Expression an HLA-E [222]. CD94-NKG2 bindet nicht direkt an HLA-G, da HLA-E-deletierte Zellen nicht gegen die Lyse durch CD94-NKG2-positive NK-Zellklone geschützt sind [223].

5.7 Ausblick: Einsatz anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Zellen beim Tissue Engineering

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte keine Aussage darüber gemacht werden, ob der Einsatz von anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Keratinozyten im Hauttransplantationsmodell zu einer verminderten Abstoßungsreaktion führt, da die Transplantation von gezüchteten Rattenhautstücken technisch noch nicht etabliert war. Eine weitere Möglichkeit für die Hauttransplantation im Rattenmodell wäre die Aussaat einer Keratinozytensuspension in das Wundbett, unter die Transplantationskammer. Durch die Verwendungen eines kommerziell erhältlichen Fibrinklebers könnte eine Stabilisierung der Wunde erreicht werden und die Zellen hätten die Möglichkeit, auf dem Wundbett zu proliferieren und einen Zellverband *in situ* zu bilden. Bei mehrschichtigem Wachstum der Zellen wäre die Ausbildung einer dünnen Hautschicht auf der Wunde möglich. Diese vielversprechende Methode wurde auch tierexperimentell im Vergleich mit "Keratinozyten-Sheets" getestet [224]. Erste Ergebnisse weisen darauf hin, dass der Einsatz von Keratinozyten-Fibrinkleber-Suspensionen im athymischen Nacktmausmodell zu einer makroskopisch und mikroskopisch vergleichbaren Wundheilung führt wie der konventioneller "Sheet-Transplantate". In der Frühphase der Wundheilung entwickelt sich nach Transplantation der Keratinozyten-Fibrinkleber-Suspension eine reifere Basalmembran als nach "Sheet-Transplantation", was eine stabilere Haftung an der Dermis bewirkt, welche die Belastbarkeit des Hauttransplantats steigert. Eine weitere Möglichkeit wäre die *in vitro*-

Herstellung eines Kollagengels aus Rattenschwanzkollagen mit oder ohne Fibroblasten und ausgesäten Keratinozyten. Diese Methode wird derzeit erfolgreich im Mausmodell von der Gruppe Fusenig (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) eingesetzt [225]. Eine dritte Strategie zur Generierung transplantierbarer Hautschichten wäre das Aufbringen der kultivierten Keratinozyten auf eine dermisähnlichen Basis (Epiflex®, Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz GmbH, DIZG, Abteilung Gewebebank Leipzig). Durch diese stabile Unterlage wären die sehr dünnen "Keratinozyten-Sheets" weniger scherkraftempfindlich und besser transplantierbar.

Sollten sich allogene anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Keratinozyten tatsächlich im Tiermodell als vermindert immunogen und ohne Abstoßungsreaktion transplantierbar erweisen, wären sie in der Transplantationsmedizin vielfältig einsetzbar. Sie könnten anstelle autologer bzw. allogener epidermaler Transplantate eingesetzt werden. Beim Ersatz autologer Keratinozyten könnte die langen Wartezeiten vermieden werden, beim Ersatz allogener Keratinozyten die stille Abstoßungsreaktion. Obwohl diese stille Rejektion ohne klinische Merkmale verläuft, könnte bei großflächigen Wunden problematisch werden und außerdem eine Sensibilisierung zur Folge haben, die bei mehrmaliger Transplantation (chronische Wunden) zu einer akzelerierten Abstoßungsreaktion führen könnte.

Bereits kommerziell erhältliche synthetische Wundabdeckungen wie Alloderm, Integra oder Dermagraft-TC könnten durch die Kombination mit diesen MHC-I-defizienten Keratinozyten in ihrer Qualität verbessert werden. In die Dermalschicht könnten die modifizierten Keratinozyten eingesät werden, die dann die epidermale Komponente der Haut synthetisieren würden. Intrabody-exprimierende Keratinozyten würden in Kombination mit Alloderm dessen synthetische Dermis mit einer vitalen Epidermis ausstatten, die in der Lage wäre, heilungsfördernde Faktoren zu sezernieren. Ferner könnte die MHC-I-defiziente epidermale Schicht die Silikon-Epidermis von Integra oder Dermagraft-TC ersetzen. Hierdurch könnte die Entfernung der Silikonmembran und die notwendige Zweittransplantation autologer Haut vermieden werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, die bisher verwendeten allogenen fetalen Keratinozyten in Apligraf zu ersetzen. Zusätzlich könnten durch Intrabody-Expression auch MHC-I-defiziente Fibroblasten generiert werden, die ebenfalls anstelle der fetalen Zellen eingesetzt werden könnten. Da es bei der derzeitigen Gesetzeslage in Deutschland in naher Zukunft nicht möglich sein wird, Zellen fetalen Ursprungs zu Transplantationszwecken einzusetzen, wäre eine Verwendung dieses "modifizierten Apligraf"-Produkts in der deutschen Transplantationsmedizin möglich. Hinzu kommt, dass ein Großteil der Bevölkerung die kommerzielle Verwendung fetalen Materials in der Medizin aus ethischen Gründen ablehnt.

Bei dem Einsatz anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender Keratinozyten in der Hauttransplantation muss selbstverständlich gewährleistet sein, dass mit den Zellen keine Viruserkrankungen auf den Patienten übertragen werden. Ein Restrisiko wird dabei - wie bei jeder Verwendung lebendigen Materials - leider nicht auszuschließen sein. Da die Zellen jedoch nur eine beschränkte Lebenszeit haben und später durch körpereigene Zellen ersetzt werden, ist das Risiko jedoch relativ gering.

Der Ansatz der Züchtung (anti-MHC-I-Intrabody-exprimierender) nicht-immunogener, allogener Zellen für das Tissue Engineering kann auf weitere Transplantate übertragen werden: z.B. können Chondrozyten für die Knorpeltransplantation gezüchtet werden, Hepatozyten in der Entwicklung artifizieller Leberorganoide eingesetzt werden, Inselzellen bei von Diabetes mellitus transplantiert werden, Nervenzellen in der Zelltransplantation beim Parkinson-Syndrom eingesetzt werden oder die Endothelialisierung künstlicher Bypässe verwirklicht werden.

Neben dem großen Einsatzgebiet in der Transplantation ist eine Testung der Intrabody-exprimierenden Keratinozyten im Rattentransplantationsmodell auch für die Grundlagenforschung sehr interessant. Alle bisher publizierten Transplantations-Experimente wurden mit Transplantaten aus α_2 -Mikroglobulin- oder TAP-knock-out Mäusen durchgeführt, bei denen keine vollständige Entfernung aller MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche erreicht werden konnte. Hinzu kommt, dass in diesen Modellen nie die MHC-I-Expression unter inflammatorischen Bedingungen, wie dem Vorhandensein von Interferon-, quantifiziert wurde. Die wenigen nicht zurückgehaltenen MHC-I-Moleküle könnten für die Erkennung durch zytotoxische T-Zellen ausreichend sein und vor allem bei der Transplantation von Haut zu einer (in der Regel sehr starken) Rejektion führen. So wurden z.B. Hauttransplantate α_2 -Mikroglobulin-defizienter Mäuse von Wildtyp-Mäusen abgestoßen und es wurde von den Autoren Lee et al. diskutiert, dass hierfür die Restexpression an MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche verantwortlich sein könnte [42]. Durch den *in vivo*-Einsatz von Intrabody-exprimierenden, phänotypischen MHC-I-"knock-out"-Keratinozyten im allogenen Transplantationsmodell ist es nun möglich, die Bedeutung des MHC-I-Moleküls für die allogene Rejektion näher zu charakterisieren.

Literaturverzeichnis

- 1 Bjorkman PJ, Parham P (1990) **Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules.** *Annu. Rev. Biochem.* 59:253-288
- 2 Uebel S, Tampé R (1999) **Specificity of the proteasome and the TAP transporter.** *Curr. Opin. Immunol.* 11(2):203-208
- 3 Townsend A, Ohlén C, Bastin J, Ljunggren HG, Foster L, Kärre K (1989) **Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides [see comments].** *Nature* 340(6233):443-448
- 4 Müllbacher A (1997) **Hypothesis: MHC class I, rather than just a flagpole for CD8+ T cells is also a protease in its own right.** *Immunol. Cell Biol.* 75(3):310-317
- 5 Falk K, Rötzschke O, Rammensee HG (1990) **Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules [see comments].** *Nature* 348(6298):248-251
- 6 Hughes EA, Ortmann B, Surman M, Cresswell P (1996) **The protease inhibitor, N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-leucyl-L-norleucinal, decreases the pool of major histocompatibility complex class I-binding peptides and inhibits peptide trimming in the endoplasmic reticulum.** *J. Exp. Med.* 183(4):1569-1578
- 7 Elliott T, Willis A, Cerundolo V, Townsend A (1995) **Processing of major histocompatibility class I-restricted antigens in the endoplasmic reticulum.** *J. Exp. Med.* 181(4):1481-1491
- 8 Snyder HL, Yewdell JW, Bennink JR (1994) **Trimming of antigenic peptides in an early secretory compartment.** *J. Exp. Med.* 180(6):2389-2394
- 9 Roelse J, Grommé M, Momburg F, Hämmerling G, Neefjes J (1994) **Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the cytosol during recycling.** *J. Exp. Med.* 180(5):1591-1597
- 10 Cresswell P, Arunachalam B, Bangia N, Dick T, Diedrich G, et al (1999) **Thiol oxidation and reduction in MHC-restricted antigen processing and presentation.** *Immunol. Res.* 19(2-3):191-200
- 11 Oliver JD, Roderick HL, Llewellyn DH, High S (1999) **ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin.** *Mol. Biol. Cell* 10(8):2573-2582
- 12 Van der Wal FJ, Oliver JD, High S (1998) **The transient association of ERp57 with N-glycosylated proteins is regulated by glucose trimming.** *Eur. J. Biochem.* 256(1):51-59
- 13 Morrice NA, Powis SJ (1998) **A role for the thiol-dependent reductase ERp57 in the assembly of MHC class I molecules.** *Curr. Biol.* 8(12):713-716
- 14 Hughes EA, Cresswell P (1998) **The thiol oxidoreductase ERp57 is a component of the MHC class I peptide-loading complex.** *Curr. Biol.* 8(12):709-712

- 15 Bergeron JJ, Brenner MB, Thomas DY, Williams DB (1994) **Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum.** *Trends Biochem. Sci.* 19(3):124-128
- 16 Hammond C, Helenius A (1995) **Quality control in the secretory pathway.** *Curr. Opin. Cell Biol.* 7(4):523-529
- 17 Williams DB, Watts TH (1995) **Molecular chaperones in antigen presentation.** *Curr. Opin. Immunol.* 7(1):77-84
- 18 Scott JE, Dawson JR (1995) **MHC class I expression and transport in a calnexin-deficient cell line.** *J. Immunol.* 155(1):143-148
- 19 Balow JP, Weissman JD, Kears KP (1995) **Unique expression of major histocompatibility complex class I proteins in the absence of glucose trimming and calnexin association.** *J. Biol. Chem.* 270(48):29025-29029
- 20 David V, Hochstenbach F, Rajagopalan S, Brenner MB (1993) **Interaction with newly synthesized and retained proteins in the endoplasmic reticulum suggests a chaperone function for human integral membrane protein IP90 (calnexin).** *J. Biol. Chem.* 268(13):9585-9592
- 21 Sönnichsen B, Füllekrug J, Nguyen Van P, Diekmann W, Robinson DG, Mieskes G (1994) **Retention and retrieval: both mechanisms cooperate to maintain calreticulin in the endoplasmic reticulum.** *J. Cell Sci.* 107(Pt 10):2705-2717
- 22 Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P (1996) **Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP.** *Immunity* 5(2):103-114
- 23 Heemels MT, Ploegh H (1995) **Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides.** *Annu. Rev. Biochem.* 64:463-491
- 24 DeMars R, Rudersdorf R, Chang C, Petersen J, Strandtmann J, et al (1985) **Mutations that impair a posttranscriptional step in expression of HLA-A and -B antigens.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82(23):8183-8187
- 25 Neefjes JJ, Momburg F, Hämmerling GJ (1993) **Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter [published erratum appears in Science 1994 Apr 1;264(5155):16].** *Science* 261(5122):769-771
- 26 Koopmann JO, Post M, Neefjes JJ, Hämmerling GJ, Momburg F (1996) **Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP).** *Eur. J. Immunol.* 26(8):1720-1728
- 27 Ortmann B, Copeman J, Lehner PJ, Sadasivan B, Herberg JA, et al (1997) **A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes.** *Science* 277(5330):1306-1309
- 28 Li S, Sjögren HO, Hellman U, Pettersson RF, Wang P (1997) **Cloning and functional characterization of a subunit of the transporter associated with antigen processing.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(16):8708-8713

- 29 Schoenhals GJ, Krishna RM, Grandea AG 3rd, Spies T, Peterson PA, et al (1999) **Retention of empty MHC class I molecules by tapasin is essential to reconstitute antigen presentation in invertebrate cells.** *Embo J.* 18(3):743-753
- 30 Denzin LK, Cresswell P (1995) **HLA-DM induces CLIP dissociation from MHC class II alpha beta dimers and facilitates peptide loading.** *Cell* 82(1):155-165
- 31 Weber DA, Evavold BD, Jensen PE (1996) **Enhanced dissociation of HLA-DR-bound peptides in the presence of HLA-DM [see comments].** *Science* 274(5287):618-620
- 32 Peh CA, Laham N, Burrows SR, Zhu Y, McCluskey J (2000) **Distinct functions of tapasin revealed by polymorphism in MHC class I peptide loading.** *J. Immunol.* 164(1):292-299
- 33 Peh CA, Burrows SR, Barnden M, Khanna R, Cresswell P, et al (1998) **HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading.** *Immunity* 8(5):531-542
- 34 Suh WK, Derby MA, Cohen-Doyle MF, Schoenhals GJ, Früh K, et al (1999) **Interaction of murine MHC class I molecules with tapasin and TAP enhances peptide loading and involves the heavy chain alpha3 domain.** *J. Immunol.* 162(3):1530-1540
- 35 Lewis JW, Sewell A, Price D, Elliott T (1998) **HLA-A*0201 presents TAP-dependent peptide epitopes to cytotoxic T lymphocytes in the absence of tapasin.** *Eur. J. Immunol.* 28(10):3214-3220
- 36 Deng Y, Gibbs J, Bacík I, Porgador A, Copeman J, et al (1998) **Assembly of MHC class I molecules with biosynthesized endoplasmic reticulum-targeted peptides is inefficient in insect cells and can be enhanced by protease inhibitors.** *J. Immunol.* 161(4):1677-1685
- 37 Bodmer JG, Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, et al (1997) **Nomenclature for factors of the HLA System, 1996.** *Hum. Immunol.* 53(1):98-128
- 38 Raulet DH (1994) **MHC class I-deficient mice.** *Adv. Immunol.* 55:381-421
- 39 Kleijmeer MJ, Kelly A, Geuze HJ, Slot JW, Townsend A, Trowsdale J (1992) **Location of MHC-encoded transporters in the endoplasmic reticulum and cis-Golgi.** *Nature* 357(6376):342-344
- 40 Bix M, Raulet D (1992) **Functionally conformed free class I heavy chains exist on the surface of beta 2 microglobulin negative cells.** *J. Exp. Med.* 176(3):829-834
- 41 Freland S, Chambers BJ, Andersson M, Van Kaer L, Ljunggren HG (1998) **Rejection of allogeneic and syngeneic but not MHC class I-deficient tumor grafts by MHC class I-deficient mice.** *J. Immunol.* 160(2):572-579
- 42 Lee RS, Grusby MJ, Laufer TM, Colvin R, Glimcher LH, Auchincloss H Jr (1997) **CD8+ effector cells responding to residual class I antigens, with help from CD4+ cells stimulated indirectly, cause rejection of major histocompatibility complex-deficient skin grafts.** *Transplantation* 63(8):1123-1133
- 43 Ljunggren HG, Van Kaer L, Sabatine MS, Auchincloss H Jr, Tonegawa S, Ploegh HL (1995) **MHC class I expression and CD8+ T cell development in TAP1/beta 2-microglobulin double mutant mice.** *Int. Immunol.* 7(6):975-984

- 44 Wei ML, Cresswell P (1992) **HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides [see comments]**. *Nature* 356(6368):443-446
- 45 Markmann JF, Bassiri H, Desai NM, Odorico JS, Kim JI, et al (1992) **Indefinite survival of MHC class I-deficient murine pancreatic islet allografts**. *Transplantation* 54(6):1085-1089
- 46 Qian S, Fu F, Li Y, Lu L, Rao AS, et al (1996) **Impact of donor MHC class I or class II antigen deficiency on first- and second-set rejection of mouse heart or liver allografts**. *Immunology* 88(1):124-129
- 47 Cagiannos C, Zhong R, Zang Z, Jiang J, Garcia BM, et al (1998) **Effect of major histocompatibility complex expression on murine intestinal graft survival**. *Transplantation* 66(10):1369-1374
- 48 Coffman T, Geier S, Ibrahim S, Griffiths R, Spurney R, et al (1993) **Improved renal function in mouse kidney allografts lacking MHC class I antigens**. *J. Immunol.* 151(1):425-435
- 49 Zijlstra M, Auchincloss H Jr, Loring JM, Chase CM, Russell PS, Jaenisch R (1992) **Skin graft rejection by beta 2-microglobulin-deficient mice**. *J. Exp. Med.* 175(4):885-893
- 50 Auchincloss H Jr, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH (1993) **The role of indirect recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(8):3373-3377
- 51 Biocca S, Neuberger MS, Cattaneo A (1990) **Expression and targeting of intracellular antibodies in mammalian cells**. *Embo J.* 9(1):101-108
- 52 Werge TM, Biocca S, Cattaneo A (1990) **Intracellular immunization. Cloning and intracellular expression of a monoclonal antibody to the p21ras protein**. *FEBS. Lett.* 274(1-2):193-198
- 53 Chen SY, Bagley J, Marasco WA (1994) **Intracellular antibodies as a new class of therapeutic molecules for gene therapy**. *Hum. Gene Ther.* 5(5):595-601
- 54 Marasco WA, Haseltine WA, Chen SY (1993) **Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody [see comments]**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(16):7889-7893
- 55 Whitlow M, Filpula D (1991) **Single-chain Fv proteins and their fusion proteins**. *Methods Enzymol.* 2(2):97-105
- 56 Reiter Y, Brinkmann U, Lee B, Pastan I (1996) **Engineering antibody Fv fragments for cancer detection and therapy: disulfide-stabilized Fv fragments**. *Nat. Biotechnol.* 14(10):1239-1245
- 57 Winter G, Milstein C (1991) **Man-made antibodies**. *Nature* 349(6307):293-299
- 58 Greenman J, Jones E, Wright MD, Barclay AN (1996) **The use of intracellular single-chain antibody fragments to inhibit specifically the expression of cell surface molecules**. *J. Immunol. Methods* 194(2):169-180

- 59 Richardson JH, Sodroski JG, Waldmann TA, Marasco WA (1995) **Phenotypic knockout of the high-affinity human interleukin 2 receptor by intracellular single-chain antibodies against the alpha subunit of the receptor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92(8):3137-3141
- 60 Richardson JH, Waldmann TA, Sodroski JG, Marasco WA (1997) **Inducible knockout of the interleukin-2 receptor alpha chain: expression of the high-affinity IL-2 receptor is not required for the *in vitro* growth of HTLV-I-transformed cell lines.** *Virology* 237(2):209-216
- 61 Jannot CB, Beerli RR, Mason S, Gullick WJ, Hynes NE (1996) **Intracellular expression of a single-chain antibody directed to the EGFR leads to growth inhibition of tumor cells.** *Oncogene* 13(2):275-282
- 62 Yuan Q, Strauch KL, Lobb RR, Hemler ME (1996) **Intracellular single-chain antibody inhibits integrin VLA-4 maturation and function.** *Biochem. J.* 318(Pt 2):591-596
- 63 Hynes NE (1993) **Amplification and overexpression of the erbB-2 gene in human tumors: its involvement in tumor development, significance as a prognostic factor, and potential as a target for cancer therapy.** *Semin. Cancer Biol.* 4(1):19-26
- 64 Beerli RR, Wels W, Hynes NE (1994) **Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation.** *J. Biol. Chem.* 269(39):23931-23936
- 65 Deshane J, Loechel F, Conry RM, Siegal GP, King CR, Curiel DT (1994) **Intracellular single-chain antibody directed against erbB2 down-regulates cell surface erbB2 and exhibits a selective anti-proliferative effect in erbB2 overexpressing cancer cell lines.** *Gene Ther.* 1(5):332-337
- 66 Grim J, Deshane J, Feng M, Lieber A, Kay M, Curiel DT (1996) **erbB-2 knockout employing an intracellular single-chain antibody (sFv) accomplishes specific toxicity in erbB-2-expressing lung cancer cells.** *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15(3):348-354
- 67 Wright M, Grim J, Deshane J, Kim M, Strong TV, et al (1997) **An intracellular anti-erbB-2 single-chain antibody is specifically cytotoxic to human breast carcinoma cells overexpressing erbB-2.** *Gene Ther.* 4(4):317-322
- 68 Deshane J, Grim J, Loechel S, Siegal GP, Alvarez RD, Curiel DT (1996) **Intracellular antibody against erbB-2 mediates targeted tumor cell eradication by apoptosis.** *Cancer Gene Ther.* 3(2):89-98
- 69 Deshane J, Cabrera G, Grim JE, Siegal GP, Pike J, et al (1995) **Targeted eradication of ovarian cancer mediated by intracellular expression of anti-erbB-2 single-chain antibody [see comments].** *Gynecol. Oncol.* 59(1):8-14
- 70 Deshane J, Siegal GP, Alvarez RD, Wang MH, Feng M, et al (1995) **Targeted tumor killing via an intracellular antibody against erbB-2.** *J. Clin. Invest.* 96(6):2980-2989
- 71 Deshane J, Siegal GP, Wang M, Wright M, Bucy RP, et al (1997) **Transductional efficacy and safety of an intraperitoneally delivered adenovirus encoding an anti-erbB-2 intracellular single-chain antibody for ovarian cancer gene therapy.** *Gynecol. Oncol.* 64(3):378-385
- 72 Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Cattaneo A (1993) **Intracellular expression of anti-p21ras single chain Fv fragments inhibits meiotic maturation of xenopus oocytes.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 197(2):422-427

- 73 Biocca S, Pierandrei-Amaldi P, Campioni N, Cattaneo A (1994) **Intracellular immunization with cytosolic recombinant antibodies.** *Biotechnology. (N. Y).* 12(4):396-399
- 74 Werge TM, Baldari CT, Telford JL (1994) **Intracellular single chain Fv antibody inhibits Ras activity in T-cell antigen receptor stimulated Jurkat cells.** *FEBS. Lett.* 351(3):393-396
- 75 Montano X, Jimenez A (1995) **Intracellular expression of the monoclonal anti-ras antibody Y13-259 blocks the transforming activity of ras oncogenes.** *Cell Growth Differ.* 6(5):597-605
- 76 Cochet O, Kenigsberg M, Delumeau I, Virone-Oddos A, Multon MC, et al (1998) **Intracellular expression of an antibody fragment-neutralizing p21 ras promotes tumor regression.** *Cancer Res.* 58(6):1170-1176
- 77 Levin R, Mhashilkar AM, Dorfman T, Bukovsky A, Zani C, et al (1997) **Inhibition of early and late events of the HIV-1 replication cycle by cytoplasmic Fab intrabodies against the matrix protein, p17.** *Mol. Med.* 3(2):96-110
- 78 Maciejewski JP, Weichold FF, Young NS, Cara A, Zella D, et al (1995) **Intracellular expression of antibody fragments directed against HIV reverse transcriptase prevents HIV infection *in vitro* [see comments].** *Nat. Med.* 1(7):667-673
- 79 Levy-Mintz P, Duan L, Zhang H, Hu B, Dornadula G, et al (1996) **Intracellular expression of single-chain variable fragments to inhibit early stages of the viral life cycle by targeting human immunodeficiency virus type 1 integrase [published erratum appears in J Virol 1998 Apr;72(4):3505-6].** *J. Virol.* 70(12):8821-8832
- 80 Mhashilkar AM, Bagley J, Chen SY, Szilvay AM, Helland DG, Marasco WA (1995) **Inhibition of HIV-1 Tat-mediated LTR transactivation and HIV-1 infection by anti-Tat single chain intrabodies.** *Embo J.* 14(7):1542-1551
- 81 Duan L, Bagasra O, Laughlin MA, Oakes JW, Pomerantz RJ (1994) **Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(11):5075-5079
- 82 Wu Y, Duan L, Zhu M, Hu B, Kubota S, et al (1996) **Binding of intracellular anti-Rev single chain variable fragments to different epitopes of human immunodeficiency virus type 1 rev: variations in viral inhibition [published erratum appears in J Virol 1998 Apr;72(4):3505-6].** *J. Virol.* 70(5):3290-3297
- 83 Signäs C, Katze MG, Persson H, Philipson L (1982) **An adenovirus glycoprotein binds heavy chains of class I transplantation antigens from man and mouse.** *Nature* 299(5879):175-178
- 84 Wold WS, Cladaras C, Deutscher SL, Kapoor QS (1985) **The 19-kDa glycoprotein coded by region E3 of adenovirus. Purification, characterization, and structural analysis.** *J. Biol. Chem.* 260(4):2424-2431
- 85 Andersson M, Pääbo S, Nilsson T, Peterson PA (1985) **Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance.** *Cell* 43(1):215-222

- 86 Burgert HG, Kvist S (1985) **An adenovirus type 2 glycoprotein blocks cell surface expression of human histocompatibility class I antigens.** *Cell* 41(3):987-997
- 87 Pääbo S, Bhat BM, Wold WS, Peterson PA (1987) **A short sequence in the COOH-terminus makes an adenovirus membrane glycoprotein a resident of the endoplasmic reticulum.** *Cell* 50(2):311-317
- 88 Gabathuler R, Kvist S (1990) **The endoplasmic reticulum retention signal of the E3/19K protein of adenovirus type 2 consists of three separate amino acid segments at the carboxy terminus.** *J. Cell Biol.* 111(5 Pt 1):1803-1810
- 89 Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1990) **Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum.** *Embo J.* 9(10):3153-3162
- 90 Cosson P, Letourneur F (1994) **Coatamer interaction with di-lysine endoplasmic reticulum retention motifs.** *Science* 263(5153):1629-1631
- 91 Jackson MR, Nilsson T, Peterson PA (1993) **Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum.** *J. Cell Biol.* 121(2):317-333
- 92 Ahmed CM, Chanda RS, Stow ND, Zain BS (1982) **The nucleotide sequence of mRNA for the Mr 19 000 glycoprotein from early gene block III of adenovirus 2.** *Gene* 20(3):339-346
- 93 Persson H, Jansson M, Philipson L (1980) **Synthesis and genomic site for an adenovirus type 2 early glycoprotein.** *J. Mol. Biol.* 136(4):375-394
- 94 Pääbo S, Weber F, Nilsson T, Schaffner W, Peterson PA (1986) **Structural and functional dissection of an MHC class I antigen-binding adenovirus glycoprotein.** *Embo J.* 5(8):1921-1927
- 95 Burgert HG, Kvist S (1987) **The E3/19K protein of adenovirus type 2 binds to the domains of histocompatibility antigens required for CTL recognition.** *Embo J.* 6(7):2019-2026
- 96 Lehner PJ, Karttunen JT, Wilkinson GW, Cresswell P (1997) **The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94(13):6904-6909
- 97 Jones TR, Wiertz EJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL (1996) **Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(21):11327-11333
- 98 Früh K, Gruhler A, Krishna RM, Schoenhals GJ (1999) **A comparison of viral immune escape strategies targeting the MHC class I assembly pathway.** *Immunol. Rev.* 168:157-166
- 99 Ziegler H, Thale R, Lucin P, Muranyi W, Flohr T, et al (1997) **A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments.** *Immunity* 6(1):57-66
- 100 Ahn K, Angulo A, Ghazal P, Peterson PA, Yang Y, Früh K (1996) **Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93(20):10990-10995

- 101 Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL (1996) **The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol.** *Cell* 84(5):769-779
- 102 Jones TR, Hanson LK, Sun L, Slater JS, Stenberg RM, Campbell AE (1995) **Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains.** *J. Virol.* 69(8):4830-4841
- 103 Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, et al (1996) **Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction [see comments].** *Nature* 384(6608):432-438
- 104 York IA, Roop C, Andrews DW, Riddell SR, Graham FL, Johnson DC (1994) **A cytosolic herpes simplex virus protein inhibits antigen presentation to CD8+ T lymphocytes.** *Cell* 77(4):525-535
- 105 Hill AB, Barnett BC, McMichael AJ, McGeoch DJ (1994) **HLA class I molecules are not transported to the cell surface in cells infected with herpes simplex virus types 1 and 2.** *J. Immunol.* 152(6):2736-2741
- 106 Früh K, Ahn K, Djaballah H, Sempé P, van Endert PM, et al (1995) **A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation.** *Nature* 375(6530):415-418
- 107 Ahn K, Meyer TH, Uebel S, Sempé P, Djaballah H, et al (1996) **Molecular mechanism and species specificity of TAP inhibition by herpes simplex virus ICP47.** *Embo J.* 15(13):3247-3255
- 108 Tomazin R, Hill AB, Jugovic P, York I, van Endert P, et al (1996) **Stable binding of the herpes simplex virus ICP47 protein to the peptide binding site of TAP.** *Embo J.* 15(13):3256-3266
- 109 Galocha B, Hill A, Barnett BC, Dolan A, Raimondi A, et al (1997) **The active site of ICP47, a herpes simplex virus-encoded inhibitor of the major histocompatibility complex (MHC)-encoded peptide transporter associated with antigen processing (TAP), maps to the NH2-terminal 35 residues.** *J. Exp. Med.* 185(9):1565-1572
- 110 Ahn K, Gruhler A, Galocha B, Jones TR, Wiertz EJ, et al (1997) **The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP.** *Immunity* 6(5):613-621
- 111 Hengel H, Koopmann JO, Flohr T, Muranyi W, Goulmy E, et al (1997) **A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter.** *Immunity* 6(5):623-632
- 112 Nerem RM (1992) **Tissue engineering in the USA.** *Med. Biol. Eng. Comput.* 30(4):CE8-CE12
- 113 Eaglstein WH, Falanga V (1998) **Tissue engineering for skin: an update.** *J. Am. Acad. Dermatol.* 39(6):1007-1010
- 114 Pomahac B, Svensjö T, Yao F, Brown H, Eriksson E (1998) **Tissue engineering of skin.** *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 9(3):333-344
- 115 Robert H, Bahuaud J (1999) **Autologous chondrocyte implantation. A review of techniques and preliminary results.** *Rev. Rhum. Engl. Ed.* 66(12):724-727

- 116 Brittberg M (1999) **Autologous chondrocyte transplantation.** *Clin. Orthop.* Oct(367 Suppl):S147-S155
- 117 Häuselmann HJ, Flura T, Marti C, Hauser N, Hedbom E (1998) **Von der Chondrozytenkultur zum Gelenkknorpelersatz. Entwicklung von De-novo-Knorpel *in vitro*.** *Schweiz. Med. Wochenschr.* 128(21):824-832
- 118 Riordan SM, Williams R (1999) **Extracorporeal support and hepatocyte transplantation in acute liver failure and cirrhosis.** *J. Gastroenterol. Hepatol.* 14(8):757-770
- 119 Riordan S, Williams R (1997) **Bioartificial liver support: developments in hepatocyte culture and bioreactor design.** *Br. Med. Bull.* 53(4):730-744
- 120 Reach G, Darquy S, Poitout V (1998) **Use of islet cells in cell therapy.** *Transfus. Clin. Biol.* 5(1):88-96
- 121 Dunnett SB, Kendall AL, Watts C, Torres EM (1997) **Neuronal cell transplantation for Parkinson's and Huntington's diseases.** *Br. Med. Bull.* 53(4):757-776
- 122 Prasad KN, Clarkson ED, La Rosa FG, Edwards-Prasad J, Freed CR (1998) **Efficacy of grafted immortalized dopamine neurons in an animal model of parkinsonism: a review.** *Mol Genet Metab* 65(1):1-9
- 123 Bordenave L, Rémy-Zolghadri M, Fernandez P, Bareille R, Midy D (1999) **Clinical performance of vascular grafts lined with endothelial cells.** *Endothelium* 6(4):267-275
- 124 Auböck J, Irschick E, Romani N, Kompatscher P, Höpfl R, et al (1988) **Rejection, after a slightly prolonged survival time, of Langerhans cell-free allogeneic cultured epidermis used for wound coverage in humans.** *Transplantation* 45(4):730-737
- 125 Rouabhia M, Germain L, Bélanger F, Auger FA (1993) **Cultured epithelium allografts: Langerhans cell and Thy-1+ dendritic epidermal cell depletion effects on allograft rejection.** *Transplantation* 56(2):259-264
- 126 Sorensen JC (1998) **Living skin equivalents and their application in wound healing.** *Clin. Podiatr. Med. Surg.* 15(1):129-137
- 127 Phillips TJ (1998) **New skin for old: developments in biological skin substitutes [editorial; comment].** *Arch. Dermatol.* 134(3):344-349
- 128 Kirsner RS, Falanga V, Eaglstein WH (1998) **The development of bioengineered skin.** *Trends Biotechnol.* 16(6):246-249
- 129 Rheinwald JG, Green H (1975) **Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.** *Cell* 6(3):331-343
- 130 Rheinwald JG, Green H (1977) **Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes.** *Nature* 265(5593):421-424
- 131 Gilchrist BA (1983) ***In vitro* assessment of keratinocyte aging.** *J. Invest. Dermatol.* 81(1 Suppl):184s-189s

- 132 Odessey R (1992) **Addendum: multicenter experience with cultured epidermal autograft for treatment of burns.** *J. Burn Care Rehabil.* 13(1):174-180
- 133 Phillips TJ, Gilchrest BA (1992) **Clinical applications of cultured epithelium.** *Epithelial Cell Biol.* 1(1):39-46
- 134 Limová M, Mauro T (1995) **Treatment of leg ulcers with cultured epithelial autografts: clinical study and case reports.** *Ostomy Wound Manage.* 41(8):48-50,52,54-60
- 135 Hefton JM, Caldwell D, Biozes DG, Balin AK, Carter DM (1986) **Grafting of skin ulcers with cultured autologous epidermal cells.** *J. Am. Acad. Dermatol.* 14(3):399-405
- 136 Leigh IM, Purkis PE (1986) **Culture grafted leg ulcers.** *Clin. Exp. Dermatol.* 11(6):650-652
- 137 tpi Transplant Information pte (2000):Menschliche Haut aus Haaren gezüchtet.
<<http://www.tpiweb.com/aktuell/000107.htm>>
- 138 Silvers WK, Collins NH (1979) **The behavior of H-Y-incompatible neonatal skin grafts in rats.** *Transplantation* 28(1):57-59
- 139 Viklick V, Polácková M, Wabik B (1975) **Immune capacity of mice tolerating a weakly incompatible skin allograft. I. Tolerance induction by neonatal skin graft in adult recipients or by neonatal inoculation of adult cells.** *Folia Biol. (Praha).* 21(4):209-218
- 140 Brain A, Purkis P, Coates P, Hackett M, Navsaria H, Leigh I (1989) **Survival of cultured allogeneic keratinocytes transplanted to deep dermal bed assessed with probe specific for Y chromosome.** *Bmj.* 298(6678):917-919
- 141 Kirsner RS, Falanga V, Eaglstein WH (1993) **The biology of skin grafts. Skin grafts as pharmacologic agents [see comments].** *Arch. Dermatol.* 129(4):481-483
- 142 Phillips TJ (1991) **Cultured epidermal allografts--a temporary or permanent solution?** *Transplantation* 51(5):937-941
- 143 Phillips TJ, Bhawan J, Leigh IM, Baum HJ, Gilchrest BA (1990) **Cultured epidermal autografts and allografts: a study of differentiation and allograft survival.** *J. Am. Acad. Dermatol.* 23(2 Pt 1):189-198
- 144 Phillips TJ, Kehinde O, Green H, Gilchrest BA (1989) **Treatment of skin ulcers with cultured epidermal allografts.** *J. Am. Acad. Dermatol.* 21(2 Pt 1):191-199
- 145 De Luca M, Albanese E, Cancedda R, Viacava A, Faggioni A, et al (1992) **Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogeneic cultured epithelium. A multicenter study.** *Arch. Dermatol.* 128(5):633-638
- 146 Mol MA, Nanninga PB, van Eendenburg JP, Westerhof W, Mekkes JR, van Ginkel CJ (1991) **Grafting of venous leg ulcers. An intraindividual comparison between cultured skin equivalents and full-thickness skin punch grafts [see comments].** *J. Am. Acad. Dermatol.* 24(1):77-82
- 147 Teepe RG, Koebrugge EJ, Ponc M, Vermeer BJ (1990) **Fresh versus cryopreserved cultured allografts for the treatment of chronic skin ulcers.** *Br. J. Dermatol.* 122(1):81-89

- 148 Teepe RG, Roseeuw DI, Hermans J, Koebrugge EJ, Altena T, et al (1993) **Randomized trial comparing cryopreserved cultured epidermal allografts with hydrocolloid dressings in healing chronic venous ulcers.** *J. Am. Acad. Dermatol.* 29(6):982-988
- 149 Clark RA (1993) **Basics of cutaneous wound repair.** *J. Dermatol. Surg. Oncol.* 19(8):693-706
- 150 Greiling D, Clark RA (1997) **Fibronectin provides a conduit for fibroblast transmigration from collagenous stroma into fibrin clot provisional matrix.** *J. Cell Sci.* 110(Pt 7):861-870
- 151 Choucair MM, Phillips TJ (1997) **What is new in clinical research in wound healing.** *Dermatol. Clin.* 15(1):45-58
- 152 Kraut JD, Eckhardt AJ (1995) **Combined simultaneous application of cultured epithelial autografts and Alloderm.** *Wounds* 7:137-142
- 153 O'Connor NE, Gallico GG, Compton CC, Briggs S, Remensnyder J (1990) **O'Connor NE et al.: Long term results in major pediatric burns treated with cultured epithelial autografts.** *Proc. Am. Burn. Assoc.* 22:174
- 154 Desai MH, Mlakar JM, McCauley RL, Abdullah KM, Rutan RL, et al (1991) **Lack of long-term durability of cultured keratinocyte burn-wound coverage: a case report.** *J. Burn Care Rehabil.* 12(6):540-545
- 155 Warden G (1993) **The fifth quinquennium: 1989 to 1993.** *J. Burn Care Rehabil.* 14(2 Pt 2):247-251
- 156 Burke JF, Yannas IV, Quinby WC Jr, Bondoc CC, Jung WK (1981) **Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury.** *Ann. Surg.* 194(4):413-428
- 157 Yannas IV, Burke JF (1980) **Design of an artificial skin. I. Basic design principles.** *J. Biomed. Mater. Res.* 14(1):65-81
- 158 Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, Huang C, Rubenstein RH (1980) **Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition.** *J. Biomed. Mater. Res.* 14(2):107-132
- 159 Contard P, Bartel TL, Jacobs L 2d, Perlish JS, MacDonald ED 2d, et al (1993) **Culturing keratinocytes and fibroblasts in a three-dimensional mesh results in epidermal differentiation and formation of a basal lamina-anchoring zone.** *J. Invest. Dermatol.* 100(1):35-39
- 160 Falanga V, Margolis D, Alvarez O, Auletta M, Maggiasimo F, et al (1998) **Rapid healing of venous ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. Human Skin Equivalent Investigators Group [see comments].** *Arch. Dermatol.* 134(3):293-300
- 161 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual* Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd ed.
- 162 Davis L, Kuehl M, Battey J (1994) *Basic Methods in Molecular Biology* Norwalk, CT, USA: Appleton & Lange. 2nd ed.

- 163 Chen SY, Khouri Y, Bagley J, Marasco WA (1994) **Combined intra- and extracellular immunization against human immunodeficiency virus type 1 infection with a human anti-gp120 antibody.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(13):5932-5936
- 164 Kolls J, Peppel K, Silva M, Beutler B (1994) **Prolonged and effective blockade of tumor necrosis factor activity through adenovirus-mediated gene transfer [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1994 Mar 1;91(5):1979].** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(1):215-219
- 165 Graham FL, Prevec L (1991) **Manipulation of adenovirus vector.** In *Methods in Molecular Biology*, ed. FL Graham, pp. 109-128. Clifton, NJ, USA: The Humana Press Inc.
- 166 Brown JD (1997):A rapid, non-toxic protocol for sequence-ready plasmid DNA [Article in Technical Tips Online T01281]. <<http://tto.biomednet.com/>> Posted: 26 Nov 1997.
- 167 Laemmli UK (1970) **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 227(259):680-685
- 168 Lindl T, Bauer J (1994) *Zell- und Gewebekultur* Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. 3rd ed.
- 169 Granberg C, Blomberg K, Hemmilä I, Lövgren T (1988) **Determination of cytotoxic T lymphocyte activity by time-resolved fluorometry using europium-labelled concanavalin A-stimulated cells as targets.** *J. Immunol. Methods* 114(1-2):191-195
- 170 Volgmann T, Klein-Struckmeier A, Mohr H (1989) **A fluorescence-based assay for quantitation of lymphokine-activated killer cell activity.** *J. Immunol. Methods* 119(1):45-51
- 171 Maley DT, Simon P (1990) **Cytotoxicity assays using cryopreserved target cells pre-labeled with the fluorescent marker europium.** *J. Immunol. Methods* 134(1):61-70
- 172 Bouma GJ, van der Meer-Prins PM, van Bree FP, van Rood JJ, Claas FH (1992) **Determination of cytotoxic T-lymphocyte precursor frequencies using europium labeling as a nonradioactive alternative to labeling with chromium-51.** *Hum. Immunol.* 35(2):85-92
- 173 Cui J, Bystryń JC (1992) **An improved europium release assay for complement-mediated cytotoxicity.** *J. Immunol. Methods* 147(1):13-19
- 174 Blomberg K, Ulfstedt AC (1993) **Fluorescent europium chelates as target cell markers in the assessment of natural killer cell cytotoxicity.** *J. Immunol. Methods* 160(1):27-34
- 175 Lövgren J, Blomberg K (1994) **Simultaneous measurement of NK cell cytotoxicity against two target cell lines labelled with fluorescent lanthanide chelates.** *J. Immunol. Methods* 173(1):119-125
- 176 Bohlen H, Manzke O, Engert A, Hertel M, Hippler-Altenburg R, et al (1994) **Differentiation of cytotoxicity using target cells labelled with europium and samarium by electroporation.** *J. Immunol. Methods* 173(1):55-62
- 177 Patel AK, Boyd PN (1995) **An improved assay for antibody dependent cellular cytotoxicity based on time resolved fluorometry.** *J. Immunol. Methods* 184(1):29-38

- 178 Blomberg K, Granberg C, Hemmilä I, Lövgren T (1986) **Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence.** *J. Immunol. Methods* 86(2):225-229
- 179 Blomberg K, Granberg C, Hemmilä I, Lövgren T (1986) **Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. II. A novel non-radioactive method based on time-resolved fluorescence. significance and specificity of the method.** *J. Immunol. Methods* 92(1):117-123
- 180 Soini E, Hemmilä I (1979) **Fluoroimmunoassay: present status and key problems.** *Clin. Chem.* 25(3):353-361
- 181 Soini E, Kojola H (1983) **Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates--a new generation of nonisotopic immunoassays.** *Clin. Chem.* 29(1):65-68
- 182 Hemmilä I, Dakubu S, Mikkilä VM, Siitari H, Lövgren T (1984) **Europium as a label in time-resolved immunofluorometric assays.** *Anal. Biochem.* 137(2):335-343
- 183 Europium replaces ⁵¹Cr as a marker in cytotoxicity assays (1994) In *Wallac Application Notes*, . .
- 184 Time-resolved fluorometry - the key to improved assay sensitivity (2000):
<<http://www.wallac.com/catalog/trf.htm>>
- 185 Martin AC (1997):Antibodies - Structure and Sequence: The Chothia Numbering Scheme.
<<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/GeneralInfo.html#chothianum>>
- 186 Martin AC, Thornton JM (1996) **Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application to antibodies.** *J. Mol. Biol.* 263(5):800-815
- 187 Lewis MJ, Sweet DJ, Pelham HR (1990) **The ERD2 gene determines the specificity of the luminal ER protein retention system.** *Cell* 61(7):1359-1363
- 188 Pelham HR (1989) **Control of protein exit from the endoplasmic reticulum.** *Annu. Rev. Cell Biol.* 5:1-23
- 189 Lewis MJ, Pelham HR (1992) **Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum.** *Cell* 68(2):353-364
- 190 Wilson DW, Lewis MJ, Pelham HR (1993) **pH-dependent binding of KDEL to its receptor *in vitro*.** *J. Biol. Chem.* 268(10):7465-7468
- 191 Beier DC, Cox JH, Vining DR, Cresswell P, Engelhard VH (1994) **Association of human class I MHC alleles with the adenovirus E3/19K protein.** *J. Immunol.* 152(8):3862-3872
- 192 López-Botet M, Bellón T (1999) **Natural killer cell activation and inhibition by receptors for MHC class I.** *Curr. Opin. Immunol.* 11(3):301-307
- 193 Shaw S, Turni LA, Katz KS (eds.) (1999):Protein Reviews On the Web (PROW).
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PROW/>> Posted: 15 Okt 1999.
- 194 Leibson PJ (1997) **Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer.** *Immunity* 6(6):655-661

- 195 Lanier LL, Corliss BC, Wu J, Leong C, Phillips JH (1998) **Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells [see comments]**. *Nature* 391(6668):703-707
- 196 Colonna M, Navarro F, Bellón T, Llano M, García P, et al (1997) **A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells [see comments]**. *J. Exp. Med.* 186(11):1809-1818
- 197 Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, Söderström K, D'Andrea A, et al (1998) **HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C [see comments]**. *Nature* 391(6669):795-799
- 198 Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG (1998) **Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis**. *J. Exp. Med.* 187(5):813-818
- 199 Lee N, Llano M, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, et al (1998) **HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A [see comments]**. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(9):5199-5204
- 200 Lee N, Goodlett DR, Ishitani A, Marquardt H, Geraghty DE (1998) **HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences**. *J. Immunol.* 160(10):4951-4960
- 201 Braud VM, Allan DS, Wilson D, McMichael AJ (1998) **TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide**. *Curr. Biol.* 8(1):1-10
- 202 Carretero M, Palmieri G, Llano M, Tullio V, Santoni A, et al (1998) **Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants**. *Eur. J. Immunol.* 28(4):1280-1291
- 203 Cantoni C, Biassoni R, Pende D, Sivori S, Accame L, et al (1998) **The activating form of CD94 receptor complex: CD94 covalently associates with the Kp39 protein that represents the product of the NKG2-C gene**. *Eur. J. Immunol.* 28(1):327-338
- 204 Ryan JC, Niemi EC, Nakamura MC, Seaman WE (1995) **NKR-P1A is a target-specific receptor that activates natural killer cell cytotoxicity**. *J. Exp. Med.* 181(5):1911-1915
- 205 Bezouska K, Yuen CT, O'Brien J, Childs RA, Chai W, et al (1994) **Oligosaccharide ligands for NKR-P1 protein activate NK cells and cytotoxicity [published erratum appears in Nature 1996 Apr 11;380(6574):559]**. *Nature* 372(6502):150-157
- 206 Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, et al (1998) **Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity**. *J. Exp. Med.* 188(5):953-960
- 207 Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, et al (1999) **Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells**. *J. Exp. Med.* 190(10):1505-1516

- 208 Cantoni C, Bottino C, Vitale M, Pessino A, Augugliaro R, et al (1999) **NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily.** *J. Exp. Med.* 189(5):787-796
- 209 Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, et al (1999) **NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells.** *Eur. J. Immunol.* 29(5):1656-1666
- 210 Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, et al (1998) **NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis.** *J. Exp. Med.* 187(12):2065-2072
- 211 Bix M, Liao NS, Zijlstra M, Loring J, Jaenisch R, Raulet D (1991) **Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice.** *Nature* 349(6307):329-331
- 212 Ljunggren HG, Van Kaer L, Ploegh HL, Tonegawa S (1994) **Altered natural killer cell repertoire in Tap-1 mutant mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91(14):6520-6524
- 213 Höglund P, Ohlén C, Carbone E, Franksson L, Ljunggren HG, et al (1991) **Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta 2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(22):10332-10336
- 214 Shimizu Y, DeMars R (1989) **Demonstration by class I gene transfer that reduced susceptibility of human cells to natural killer cell-mediated lysis is inversely correlated with HLA class I antigen expression.** *Eur. J. Immunol.* 19(3):447-451
- 215 Storkus WJ, Alexander J, Payne JA, Dawson JR, Cresswell P (1989) **Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86(7):2361-2364
- 216 Carosella ED, Dausset J, Kirszenbaum M (1996) **HLA-G revisited.** *Immunol. Today* 17(9):407-409
- 217 Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R (1990) **A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts.** *Science* 248(4952):220-223
- 218 King A, Loke YW, Chaouat G (1997) **NK cells and reproduction [see comments].** *Immunol. Today* 18(2):64-66
- 219 Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, et al (1998) **HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95(8):4510-4515
- 220 Pazmany L, Mandelboim O, Valés-Gómez M, Davis DM, Reyburn HT, Strominger JL (1996) **Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells.** *Science* 274(5288):792-795

- 221 Cantoni C, Verdiani S, Falco M, Pessino A, Cilli M, et al (1998) **p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily.** *Eur. J. Immunol.* 28(6):1980-1990
- 222 Tomasec P, Braud VM, Rickards C, Powell MB, McSharry BP, et al (2000) **Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40.** *Science* 287(5455):1031-1033
- 223 Navarro F, Llano M, Bellón T, Colonna M, Geraghty DE, López-Botet M (1999) **The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells.** *Eur. J. Immunol.* 29(1):277-283
- 224 Werner KG (ed.) (1998):Handlungsleitlinie für die ambulante Behandlung von Verbrennungen 1. und 2. Grades. <<http://www.cnhfi.de/Verbrennung.htm>> Posted: 4 Aug 1998.
- 225 Stark HJ, Baur M, Breitzkreutz D, Mirancea N, Fusenig NE (1999) **Organotypic keratinocyte cocultures in defined medium with regular epidermal morphogenesis and differentiation.** *J. Invest. Dermatol.* 112(5):681-691

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| ' | Minute(n) |
| " | Sekunde(n) |
| à | zu (je) |
| Å | Angström |
| Abb. | Abbildung |
| APAAP | alkalische Phosphatase - anti-alkalische Phosphatase |
| APZ | antigenpräsentierende Zelle(n) |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser ('Aqua destillata') |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| b-Gal. | beta-Galaktosidase |
| b2m | beta-2-Mikroglobulin |
| BLAST | 'Basic Local Alignment Search Tool' |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CDR | 'complementary determined regions' |
| CH | konstante schwere Region eines Antikörpers ('constant heavy') |
| cm | Zentimeter |
| cm ² | Quadratzenimeter |
| CO ₂ | Kohlendioxid |
| COP I | Koatomer-Komplex I |
| d | Tag(e) |
| DEAE | Diethylaminoethyl |
| DEPC | Diethyl-Pyrocarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxyd |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| ds | doppelsträngig |

| | |
|--------|---|
| DTPA | Diethylentriamin-pentaessigsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EB | Ethidiumbromid |
| EDTA | Ethylldiamin-Tetraessigsäure-Na-Salz |
| EGF | Epidermaler Wachstumsfaktor ('epidermal growth factor') |
| EGFP | verstärkt-fluoreszierendes GFP ('enhanced' GFP) |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FR | 'framework' |
| g | Gramm |
| GFP | grün-fluoreszierendes Protein ('green fluorescent protein') |
| h | Stunde(n) |
| HEPES | N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |
| HLA | humanes Leukozytenantigen ('human leucocyte antigen') |
| HSV | Herpes simplex virus |
| HTLV-I | 'human lymphotropic virus type I' |
| ICAM-1 | 'intercellular adhesion molecule' |
| IE | 'immediate early' |
| IL | Interleukin |
| ILT | 'immunoglobulin-like transcript' |
| IRES | 'intraribosomal entry site' |
| ITAM | 'immunoreceptor tyrosine-based activation motif' |
| ITIM | 'immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs' |
| kb | Kilobasen |
| kD | Kilodalton |
| KIR | 'killer immunoglobulin-like receptor' |
| Ktr. | Kontrolle |
| M | Mol |
| max. | maximal |
| mCi | Millicurie |

| | |
|--------|---|
| MCMV | murines Zytomegalievirus |
| MHC | Haupthistokompatibilitätskomplex ('major histocompatibility complex') |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimol |
| MOI | ' multiplicity of infection' |
| mRNA | 'messenger' RNA |
| MW | Molekulargewicht ('molecular weight') |
| NCBI | 'National Center for Biotechnology Information' |
| neg. | negativ |
| Neo | Neomycin |
| ng | Nanogramm |
| nM | Nanomol |
| nm | Nanometer |
| No. | Nummer |
| PBS | Phospat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline) |
| PDI | Proteindisulfidisomerase |
| pfu | 'plaque forming unit' |
| PIPES | Piperazin-N,N'-bis-Ethansulfonsäure |
| pmol | Pikomol |
| PMSF | Phenylmethylsulfonsäure |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat ('sodium dodecyl sulfate') |
| sFv | 'single chain' |
| SHP | Proteintyrosinphosphatase mit SH2-Domänen |
| spont. | spontan |
| SV40 | 'simian virus type 40' |
| T7 | Bakteriophage T7 |

| | |
|--------|--|
| TAP | 'Transporter associated with Antigen Processing' |
| TBE | Tris-Borat-EDTA-Puffer |
| theor. | theoretisch |
| UpM | Umdrehungen pro Minute |
| US | 'ultra short' |
| UV | ultraviolett |
| VH | variable schwere Region eines Antikörpers ('variable heavy') |
| VL | variable leichte Region eines Antikörpers ('variable light') |
| vs. | versus |
| ZAP70 | 'zeta chain-associated protein 70 kD' |

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Immunologie für die gute Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft untereinander bedanken. Das lebendige und dynamische Klima innerhalb der Arbeitsgruppe hat die vielen "Durststrecken" während meiner Arbeit wesentlich erträglicher gemacht.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Hans-Dieter Volk, der die ausgesprochen interessante Aufgabenstellung entwickelt hat. Durch viele stimulierende Diskussionen und wertvolle Anregungen hat er es geschafft, mich immer wieder neu zu motivieren und für das Thema zu begeistern - trotz der unzähligen Misserfolge. Es ist im Wesentlichen auch sein Verdienst, dass die Gruppe "Volk" so lebhaft ist. Darüber hinaus ist durch seine große Kooperationsbereitschaft eine Zusammenarbeit mit dem Dana-Farber Cancer Institute in Boston entstanden, wo ich die Konstruktion von Intrabodies erlernen konnte.

Martina Seifert möchte ich für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, insbesondere auch im menschlichen Bereich danken. Ihre Unterstützung, vor allem was Aufmunterung und Hilfsbereitschaft angeht, hat maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen.

Heide Reil möchte ich besonders für die zahlreichen Gespräche über Wissenschaft und Lebensphilosophie danken. Wie war das, Heide - "Wissenschaft ist, wenn man trotzdem lacht"!

Gerald Grütz möchte ich vor allem dafür danken, dass er mich in der Durchführung der "GFP-Fusionsprotein"-Strategie bestärkt hat - war mal wieder der richtige Ansporn zum richtigen Zeitpunkt. Danke Gerald.

Elke Effenberger und Heinz Tanzmann danke ich für die tatkräftige und kompetente Unterstützung bei der Keratinozytenkultur bzw. der Virusaufräumarbeit. Ohne sie hätte vieles nicht funktioniert.

Cornelia Doebis danke ich für die Adenovirus-Infektionen und die seelische Unterstützung bei meinem ersten Vortrag in Nantes, Frankreich. Merci, Conny.

Bei meinen Eltern und Jörn möchte ich mich für die rückhaltlose Unterstützung und Geduld während meiner Arbeit, gerade in den härteren Arbeitsphasen, bedanken. Jörn danke ich für die Einführung in die neue Rechtschreibung und natürlich für das "Leben nach dem Labor" - *only happy people do good work*.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Annette Busch

Geburtsdatum und -ort: 20.12.1968 in Berlin

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: verheiratet

Eltern: Prof. Dr. Wolfgang Busch Hannelore Busch, geb. Sauer

Ausbildung

Schulbildung: Juni 1988 Abitur, Kant-Gymnasium, Berlin-Spandau

Hochschulbildung: August 1988 - Mai 1989 Studium an der University Of Wyoming, USA

April 1990 - November 1994 Studium an der Technischen Fachhochschule Berlin, Fachbereich Biotechnologie

November 1994 Diplom

Abschluss: Dipl.-Ing. (FH) Biotechnologie

Diplomthema: "Unterschiede zwischen den CD28⁺ und CD28⁻ Subpopulationen von T-Gedächtniszellen"

Praktika: Oktober 1989 - März 1990 Praktikum im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Krankenhaus Moabit

Februar - Juni 1992 Praktikum am Institut für Biochemische Pharmakologie, Schering-AG, Berlin

Promotion: seit Oktober 1995 Arbeiten zur Promotion unter der Leitung von Prof. H.-D. Volk am Institut für Medizinische Immunologie, Charité Berlin (medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin)

Stipendien: Juli 1995 - Juli 1997 Stipendium nach dem Gesetz zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses (NaFöG)

Veröffentlichungen

Artikel

Höflich C, Döcke WD, Busch A, Kern F, Volk HD (1998) CD45RA(bright)/CD11a(bright) CD8+ T cells: effector T cells. *Int. Immunol.* 10(12):1837-1845

Posterpräsentationen

Busch A, Volk HD, Marasco WA, Mhashilkar AM, Ritter T; Doebis C, Seifert M: Skin Transplantation: MHC I down-regulation on keratinocytes by intrabody expression 6th Symposium on Gene Therapy, 4. - 6. Mai 1998, MDC Symposium, Berlin

Vorträge (inklusive Posterpräsentation)

Busch A, Volk HD, Marasco WA, Mhashilkar AM, Ritter T; Doebis C, Seifert M: MHC I down-regulation on keratinocytes by intrabody expression – new perspectives for skin transplantation? 6th Annual Meeting of the Nantes' "Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation" I.T.E.R.T, 10. -11. Juni 1999, Nantes, Frankreich

Busch A, Volk HD, Marasco WA, Mhashilkar AM, Ritter T; Doebis C, Seifert M: MHC I down-regulation on keratinocytes by intrabody expression – new perspectives for skin transplantation? 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, 29. September - 2. Oktober, Hannover

Busch A, Volk HD, Marasco WA, Mhashilkar AM, Ritter T; Doebis C, Seifert M: MHC I down-regulation on keratinocytes by intrabody expression – new perspectives for skin transplantation? 10th European Students Conference at the Charité, 20. -24. Oktober, Berlin

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Berlin, den 26.2.2000

Annette Busch